

From the Laboratorium voor Erfelijkheidsleer,
Landbouw Hogeschool, Wageningen

SOME SOURCES OF ERROR IN THE DETERMINATION
OF CHROMOSOME LENGTH

By

J. SYBENGA

With 2 Figures in the Text

(Eingegangen am 9. Oktober 1958/2. Februar 1959)

Introduction

In certain fields of cytology e.g. in the study of chromosomal aberrations and in cytotaxonomy exact determinations of chromosome length are sometimes required. A serious problem is the variability in the results frequently found within one organism at apparently identical states of contraction or coiling. Variation in length, when evenly distributed over the whole chromosome complement, can be attributed to variation between cells in chromosome contraction or coiling. Usually more disturbing is variation in relative length of chromosomes or chromosome arms. This is detected either as variation between cells in the percentage of a given chromosome or chromosome arm of the length of the whole complement and in the arm length ratio; or as difference between homologous chromosomes and arms within cells. Such variation may be partly due to variation in contraction within the chromosome complement of one cell. In addition an "artificial" variation can be introduced by the experimenter. This can be divided into two parts:

1. variation in actual chromosome length;
2. variation caused by inaccuracy of the measurement.

The data of CAROLI and BLIXT (1953) on the length of *Pisum* metaphase chromosomes give an impression of the variation in measured chromosome length.

The present study was undertaken to give information required for a special purpose and is limited to the "artificial" variation.

Materials and methods

Materials. The plant used in the experiments was rye, *Secale cereale*. For part 1 and 2 (see experiments and results) roottips of seedlings of population Petkus rye were used, grown at room-temperature. For part 3 roottips of three different plants in pots were taken: one Petkus population plant, one highly inbred plant and one plant from an F_2 of a cross between two inbred lines.

Methods. In all cases the chromosomes were measured in metaphase. All preparations were squash preparations as is usual with chromosome measurements.

Squashing is necessary to bring the chromosomes into a plane perpendicular to the axis of the microscope. Prefixation treatments were used in order to straighten the chromosome arms sufficiently to make exact measurement possible without the necessity to take bends into account.

The roottips were fixed and macerated for ten minutes in NHCl at 60° C, then rinsed and hardened for five minutes in 70% ethyl alcohol and transferred to 1% orceine in 45% acetic acid, where they were left overnight. The squash was made in 1% orceine in 45% acetic acid.

All prefixation treatments were carried out under standard conditions: 18 ± 0.5° C for four hours.

Measurements and photographs were made with a Zeiss W microscope; direct measurements with a Jena ocular screw micrometer. Photographic plates were Gevaert Process Extra Ortho.

More details on the methods will be given later.

Experiments and results

Part 1. The relative accuracy of some methods of chromosome measurement

Three methods of measurement were compared as to their accuracy:

a) Direct measurement of chromosomes pretreated with oxyquinoline with an ocular screw micrometer at high magnification: objective 100×, n.a. 1.25 oil; ocular 24×.

b) Measurement of the same cell in a photograph taken with objective 100×, oil; ocular 8×.

c) Measurement of the same cell in a photograph taken with objective 40×, n.a. 0.63, dry; ocular 8×.

In b and c the negative plate was projected on the linear scale of a slide rule which could be read with high precision. The magnification of the projection was such that all measurements were made on the same scale. All three methods can be used with success only when the chromosomes are sufficiently straight, which was the case with the pretreatment used.

The methods were selected for the following reasons: direct measurement with an ocular screw micrometer (a) and measurement in a photograph (b) are the most accurate methods of chromosome measurement. The first has the advantage of being possible even when the chromosomes lie in different planes, which would make a single photograph of the whole chromosome set impossible. Photographs on the other hand can be made rapidly, which is of great advantage when using temporary preparations; the measurement can be made whenever time is available. The total amount of time needed is somewhat less for photographs. A lens of lower resolving power has the advantage of larger phocus depth, allowing the use of cells the chromosomes of which are not exactly in one plane. The disadvantage is the less well defined contour of the chromosomes. Measurements made in camera lucida drawings or in direct projection (BOSE 1956) are not as accurate as with the methods described here (CASPERSSON et al. 1953).

The main cause of variability in repeated measurements on the same chromosome is vagueness of chromosome ends and constrictions. The location of the centromeres offered no problem. Other sources of error are probably of minor importance.

For estimation of the variability an index was calculated for each cell: all chromosome arms were measured twice and the differences between the measure-

ments summed. Thus each cell variability index is the sum of 30 differences (28 arms and 2 satellites). For each method of measurement 5 cells were used and treated as replications in a randomized blocks experiment. (Analysis of variance in Table 1.)

Table 1. *Variability indices of three methods of chromosome measurement*
Explanation in text

Cells	Methods			
	direct	photograph 100 ×	photograph 40 ×	total
10a	32	24	82	138
12b	34	21	32	87
12a	31	30	45	106
10b	31	29	48	108
11a	30	36	41	107
Total	158	140	248	546

Source	d. f.	S. S.	M. S.	F	P
Cells . . .	4	446.2667	111.6		
Methods . . .	2	1339.2000	669.6	4.64	< 0.05
Error . . .	8	1154.1333	144.3		
Total	14	2939.6000			

Differences:

direct—photo 100 ×	$t = 0.474$	not significant
direct—photo 40 ×	$t = 2.844$	$P < 0.05$
photo 100 ×—photo 40 ×	$t = 2.370$	$P < 0.05$

Measurements made in photographs have two sources of error: a) from the photograph (focus, movement); b) from the measurement. Direct measurements have only the second. For the comparison of the importance of both errors the same indices were used as above, but in addition a second photograph was made of each cell and again measured twice. The between-photograph variability index was calculated by first finding the sum of the differences between the two first measurements per photograph, than between the two second measurements and taking the mean of both sums. Similarly the within-photograph variability index was calculated by first taking the sum of the differences between the two measurements of the first photograph (= index as used above), then of the second and averaging these. The first index is composed of photograph variability + measurement variability. If the first is not larger than the second the variability caused by differences between photographs is negligible. The analysis of variance is given in Table 2.

Although the within photograph index is smaller than the between photograph index, the difference is not significant. Replication of photographs cannot be expected to increase the accuracy of the results, while replication of measurements within one photograph may do so.

Since photographs with a lower resolution lens are easier made than those with a high resolution lens (larger focus depth) it is of interest to know how many replications of measurement will be necessary in a low resolution photograph to get the same precision as a single measurement in a high resolution photograph. As the former measurements could not give this information a small additional

set of measurements was completed for orientation. One chromosome arm (the long arm of the satellite chromosome) was measured five times in photographs of each type in three cells. Thus the following error mean squares were obtained: high resolution ($100 \times$) 0.23375; low resolution ($40 \times$) 1.8175; ratio 7.78. For the same accuracy 8 replications are required in the low resolution photograph as compared to 1 in the high resolution photograph. The coefficients of variability are: high resolution: 0.6%; low resolution: 2.2%.

Table 2. *Between- and within-photograph variability indices compared.
Analysis of variance. Explanation in text*

		100 ×	40 ×	total
Index between measurements . . .		233	149	382
Index between photographs . . .		195	143	338
Total		428	292	720
Source	d. f.	S. S.	M. S.	F
Cells	4	465.5	116.375	1.279
Methods	3	1072.8	375.6	3.931
Measurements . . .	1	96.8	96.8	1.064
Enlargements . . .	1	924.8	924.8	10.165
Interaction	1	51.2	51.2	0.563
Error	12	1091.7	90.975	
Total	19	2630.0		

Part 2. Effect of squashing

Accurate chromosome measurements with the methods presently available are possible only when the chromosomes lie in a plane perpendicular to the axis of the microscope. This is usually brought about by squashing. In addition, unless a curvimeter is used in a camera lucida drawing or in a photograph, the chromosomes must be straight, which can be effected by proper prefixation treatments.

The assumption that squashing affects only the shape of the cell and the location of the chromosomes but not the shape of the chromosomes is incorrect. The effect of squashing was studied here first on chromosomes pretreated with oxyquinoline. This treatment gives well straightened chromosomes and makes constrictions clearly visible. The number of metaphase plates is smaller, however, than with other pretreatments.

Difference in chromosome length between squashed and unsquashed chromosomes cannot be determined in rye. Therefore two intensities of squashing were compared. After moderate squashing a cell was selected of which all chromosomes were in focus with a $40 \times$ objective. This was checked with a photograph. It was found that in this case the error introduced by a position of the chromosome arm not perpendicular to the axis of the microscope is negligible, although apparently the squashing has been insufficient to put (or to keep) all chromosomes

entirely in one plane. The focal depth is sufficient to include chromosomes of somewhat different level. Some slope of the chromosome arms cannot be excluded, but is at least very small, as checked with a $100 \times$ oil lens.

In this position the chromosome arms were measured with the ocular screw micrometer. The total length of all chromosomes per cell was calculated in addition to the sum of the arm length ratios per cell.

Next, additional pressure was applied until all chromosomes were in focus with the $100 \times$ objective, where the focus depth is considerably smaller. The total amount of squashing thus applied is usual for chromosome measurements. Again a photograph was taken for control and again the measurements as mentioned above were performed. This was carried out on 10 cells. The results are given in Table 3. The difference between both degrees of squashing is arbitrary and not quite constant.

The significant increase in total chromosome length might be explained partly by decrease in the angle between the chromosome arms and the plane perpendicular to the axis of the microscope. As pointed out above, however, this was an exception. The increase is not evenly distributed over the cell, as sometimes some chromosomes show it, while their homologues do not. The effect must be a stretching of the chromosomes as a result of pressure.

An unexpected effect of squashing is the significant increase in average arm length ratio. Although an average of arm length ratios may not have much meaning in itself, an increase caused by squashing indicates that on the average the long arms are stretched more strongly than the short arms. If squashing would bring the chromosome arms more in the plane perpendicular to the axis of the microscope one can expect that the short arm shows, on the average, a relatively larger increase in length than the long arm. Before additional squashing short arms have more opportunity to deviate from the plane mentioned than long arms and would thus show a larger relative increase when brought into this plane. If this were so, a decrease in average arm length ratio was to be expected.

As not all chromosomes of rye are easily distinguished, it was not attempted to determine exactly which chromosomes were responsible for this effect. To a limited extent conclusions were drawn from the change in variance of the arm length ratios within cells as a result of squashing. If arm length ratio increases mostly in chromosomes that have the highest ratio, the variance within cells is expected to increase. If, however, mainly the ratio of the chromosomes with the lowest ratio increases, this variance will decrease. It was found that, although the variance decreases somewhat on the average, this is not significant.

Table 3. *Effect of squashing on chromosome length and on arm length ratio*

For chromosome length: arbitrary units

Cell	Total arm length		Sum arm length ratios	
	moderate squash	hard squash	moderate squash	hard squash
3a	18.88	21.23	18.614	19.219
3b	16.23	16.93	19.282	19.331
4a	18.96	19.10	19.540	19.561
4b	20.47	21.11	19.622	19.686
5a	21.03	21.93	18.578	18.787
5b	20.92	22.04	18.854	19.186
6a	22.01	24.09	18.975	19.115
8a	23.82	24.62	20.453	20.424
8b	19.50	20.08	19.799	19.965
9a	19.91	20.10	19.572	19.844
Total	201.73	211.23	193.289	195.457

Difference: $9.50 = 4.6\%$

$2.168 = 1.1\%$

t-value: 4.11; $P < 0.01$

t-value: 3.08; $P < 0.05$

In addition a number of correlation coefficients have been calculated:

- a) between the increase in total chromosome length per cell and in average arm length ratio (10 cells): $r = +0.605$, not quite significant.
- b) between total chromosome length per cell before and after additional squashing: $r = +0.95$, highly significant.
- c) between average ratio per cell before and after additional squashing: $r = +0.96$, highly significant.
- d) between increase in length and length before additional squashing: $r = +0.16$, not significant.
- e) between increase in ratio and ratio before additional squashing: $r = -0.17$, not significant.
- f) between increase in length and length after additional squashing: $r = +0.46$, not significant.
- g) between increase in ratio and ratio after additional squashing: $r = -0.43$, not significant.
- h) between length and ratio before additional squashing: $r = +0.28$, not significant.
- i) between length and ratio after additional squashing: $r = +0.10$, not significant; the same with 10 additional cells: $r = +0.12$, not significant.

From the correlation coefficients appears that increase in length and in ratio are not correlated to the original values nor to the values obtained after additional quashing (d-g).

The increase caused by additional squashing seems to be smaller than the differences between cells already present (Table 3, correlation coefficients b and c). This can be studied more accurately on separate chromosome arms. In rye only the satellite chromosome pair can be distinguished with certainty. For this the average difference between the two homologous long arms per cell is approximately 7% of their average length (4.2μ) and approximately $1.2 \times$ the average difference due to additional squashing. This is not a significant difference. An analysis of variance showed that for length of this arm before additional squashing the between-cells-mean-square was about $10 \times$ as large as the within-cells-mean-square, a very significant difference.

For arm length ratio the average difference between the two homologous chromosomes is about 14% of the average ratio and $4.5 \times$ the average difference due to additional squashing. This is a significant difference. An analysis of variance gave almost equal mean squares for between and within cells.

The general conclusion is that the variability introduced by additional squashing is appreciably smaller than the variability already present, although it is systematic and statistically significant.

For comparison other pretreatments have been checked (colchicine 0.1% and saturated alpha bromo naphthalene). A small experiment was set up with 5 cells from different plants.

For colchicine the increase in total chromosome length and in arm length ratio was significant ($t = 2.98$ and 2.90 resp.). For alpha bromo naphthalene the increase in length was very significant ($t = 4.45$), in ratio not ($t = 0.92$). Here again an increase was found in every cell, too small, however, in comparison to the variability to be significant in such a small sample. The correlation between increase in length and increase in ratio appeared to be negative and significant for both pretreatments ($r = -0.95$ and -0.91 resp.). This peculiar result cannot yet be explained. The change in variance in arm length ratios calculated as mentioned above, was in no case significant. For colchicine an increase was found, for bromo naphthalene a decrease. The results with these two chemicals are apparently parallel to those with oxyquinoline.

Fig. 1 and 2 give an impression of the difference between high and low resolution photographs and the effect of additional squashing.

Part 3. Effect of pretreatments

In the preceding part measurements were presented following three different pretreatments. These measurements allow a comparison of the effects of these pretreatments on chromosome length.



Fig. 1

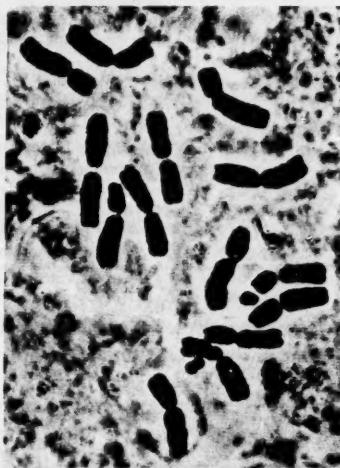


Fig. 2

Fig. 1. *Secale cereale*; roottip; cell 3^a; 2n = 14. Phase contrast and acetic orceine. Metaphase chromosomes after oxyquinoline. Moderate squashing. Objective dry 40×; n.a. 0.63. Long arm satellite chromosome approximately 4 μ

Fig. 2. Cell of Fig. 1 after additional squashing. Objective oil 100×; n.a. 1.25

Table 4 gives the average total chromosome length per cell and the average arm length ratio for the three pretreatments oxyquinoline, colchicine and bromonaphthalene with application of the full amount of squashing (see part 2).

Table 4. Average relative chromosome length (oxyquinoline = 100) and average arm length ratio after different pretreatments

	Relative chromosome length	Arm length ratio
Oxyquinoline	100.0	1.389 (average of 20)
Colchicine	89.2	1.399 (average of 5)
Bromonaphthalene . . .	105.7	1.445 (average of 5)

As for a good comparison of pretreatment effects these data are insufficient, a new series of measurements was undertaken. Now each treatment was carried out on three plants (see Materials) of each of which six cells were used. The chromosomes were measured by means of photographs taken with the 40× objective. The squashing was on the whole moderate. This method was chosen

because of its convenience, and its inaccuracy was somewhat reduced by taking the average of two measurements in each photograph. For total chromosome length per cell the following results were obtained:

oxyquinoline	115.4 μ
bromonaphthalene	110.7 μ
colchicine	98.1 μ

Under the given conditions colchicine had the strongest contracting power. The difference between oxyquinoline and bromonaphthalene is small and opposite to that in Table 4.

The same values for plants are:

plant 1	110.7 μ
plant 2	105.4 μ
plant 3	107.9 μ

Apparently the differences between plants are smaller than between treatments. The results obtained for arm length ratios are of more interest. See Table 5.

Table 5. *Average arm length ratio in different plants and after different treatments*
Each value is the average of 6 cells, each measured twice

Treatment	Plant			Average
	1	2	3	
Oxyquinoline	1.409	1.398	1.413	1.406
Bromonaphthalene	1.367	1.391	1.364	1.374
Colchicine	1.381	1.379	1.399	1.386
Average	1.386	1.389	1.392	1.389

Analysis of variance (last three decimals):

Source	d. f.	S. S.	M. S.	F	F (P 0.05)
Treatments . . .	2	9746.0	4873.0	1.959	appr. 3.21
Genotype . . .	2	358.0	179.0		
Interaction . . .	4	4420.8	1105.2		
Error	45	111961.3	2488.0		
Total	53	126486.1			

t-value largest difference (oxyquinoline — bromonaphthalene): 1.93; *t* ($P = 0.05$) appr. 2.04.

The analysis of variance shows that the differences found are not significant. It should be noted, however, that the differences between treatments are larger than those between plants. Moreover the largest difference between two treatments is almost significant at the 5% level. It is the authors opinion that the possibility of a systematic difference in average arm length ratio may not be excluded.

Finally correlation coefficients were calculated between total chromosome length per cell and average arm length ratio per cell within each treatment (18 cells): oxyquinoline $r = 0.025$; colchicine $r = 0.121$; bromonaphthalene $r = 0.021$. There is apparently no correlation between both variables.

Discussion

The present series of experiments shows that there is an effect of the method of measurement and of preparation on the result of measurement of rye chromosomes. This effect, however, is small compared

to the variability caused by other factors. Regarding the error introduced by the measurement it should be noted that with the methods used here this error is independent of the length of the chromosomes. For large chromosomes like those of rye the error is relatively small. For small chromosomes, common in many plant species, it becomes of increasing importance. A method of measurement causing a coefficient of variability of 2% in rye chromosomes will cause a coefficient of variability of 10% when the chromosomes are five times as small. This is an appreciable error, which becomes important especially when relatively large arm length ratios are found. In such cases the accuracy of the method of measurement cannot be neglected. In rye the variability due to other causes is too large to make a very exact method of measurement useful in squash preparations.

As to the method of preparation it is of interest to note that squashing gives a significant increase in chromosome length. This increase is not evenly distributed over the chromosome arms. Apparently not all parts of the chromosome complement are equally susceptible to squashing: the short arms are in general the least affected. Whether or not this is correlated with the distribution of heterochromatin, found mainly in the short arms, is not known. The increase due to additional squashing as determined here is not large. The increase due to the total amount of squashing will certainly be larger, but probably not yet equal to the variation caused by other factors. It will be disturbing only when very accurate measurements are required and the variability caused by other factors or "natural" variability is small. For less discriminating measurements the error introduced is of minor importance.

Summary

- a) Three methods of measurement of straightened rye chromosomes were compared in respect to their accuracy.
 1. Direct measurement with an ocular screw micrometer, using a $100\times$ oil immersion lens.
 2. Measurement in a photograph taken with a $100\times$ oil immersion lens.
 3. Measurement in a photograph taken with a $40\times$ dry lens.
1. and 2. were found to be of equal accuracy, giving a coefficient of variability of approximately 0.6%. 3. was less accurate, giving a coefficient of variability of approximately 2.2%. For rye chromosomes this is not serious, for smaller chromosomes it can become disturbing. Replication of measurement in the same photograph will then be useful; between photograph variability is small.
- b) The effect of squashing on chromosome length and on arm length ratio was studied for rye chromosomes. On the average squashing was

found to increase chromosome length with several percent, arm length ratio by a few percent, both effects being statistically significant. In individual cases much more extreme increase of length and ratio was found. The effect is smaller than the variability due to other causes, even if not including the variability due to inaccuracy of the method of measurement.

c) The effects of different pretreatments on chromosome length and arm length ratio in rye were compared. No significant difference regarding arm length ratio could be found between oxyquinoline, bromonaphthalene and colchicine in the concentrations used, although there are indications that such differences may exist but are masked by the large variability due to other causes.

Literature

- BOSE, S.: Aberrations in the nucleolar chromosome of inbred rye. *Hereditas* (Lund) **42**, 263—292 (1956).
- CAROLI, G., and S. BLIXT: The morphology of the chromosomes of *Pisum*. *Agr. Hort. Gen.* **11**, 133—140 (1953).
- CASPERSSON, T., T. FREDERIKSSON and K. G. THORSSON: A microplanimeter for measurement of endonuclear structure. *Hereditas* (Lund) **39**, 201—208 (1953).

Dr. Ir. J. SYBENGA,

Laboratorium voor Erfelijkheidsleer,
Landbouw Hogeschool, Wageningen, Netherlands

Present address:

Instituto Interamericano de Ciencias Agricolas; Turrialba, Costa Rica

Aus dem Botanischen Institut der Universität Wien

SPONTANE CHROMOSOMENABERRATIONEN
UND ANDERE MEIOSESTÖRUNGEN BEI DIPLOIDEN SIPPEN
DES ACHILLEA MILLEFOLIUM-KOMPLEXES
(ZUR PHYLOGENIE DER GATTUNG ACHILLEA, II.)

Von

FRIEDRICH EHRENDORFER

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Dezember 1958/25. Februar 1959)

Inhalt

	Seite
A. Einleitung	365
B. Material und Methodik	367
C. Spezieller Teil	367
1. <i>Achillea setacea</i>	368
2. <i>Achillea asplenifolia</i>	374
3. <i>Achillea roseo-alba</i>	374
4. <i>Achillea asplenifolia</i> × <i>A. setacea</i> : experimentelle Hybriden	380
5. <i>Achillea crithmifolia</i>	381
6. Weitere Arten	385
D. Allgemeiner Teil und Diskussion	385
1. Störungen der Chromosomenreproduktion: Abnömer Formwechsel und Aberrationen	385
a) Einzelkomponenten des Störungsbildes	386
b) Dynamik und Amplitude der Störungsphase	390
c) Idiotypische Steuerung der Störungen	392
2. Spindelstörungen und Restitutionskernbildung	396
3. Intra-individuelle Aneuploidie	397
4. Störungen der meiotischen Chromosomenpaarung	398
5. Versuch einer ursächlichen Deutung des Störungsbildes	399
Zusammenfassung	401
Literatur	403

A. Einleitung

Die vorliegende Arbeit stellt einen weiteren Beitrag zu einem Forschungsprogramm dar, welches die möglichst vielseitige Darstellung der raum-zeitlichen Entfaltung des Polyploid-Komplexes *Achillea millefolium* L. s. lat. zum Ziele hat. Die bisherigen Arbeiten behandeln vor allem die Ökotypenstruktur der Sippen im westlichen Nord-Amerika (CLAUSEN, KECK und HIESEY 1940, 1948), die Cytogeographie der nordamerikanischen (LAWRENCE 1947, EHRENDORFER 1952b) und mittel-europäischen Sippen (EHRENDORFER 1953a) sowie die cytogenetischen Beziehungen zwischen tetra- und hexaploiden Sippen (SCHNEIDER

1958: Beitrag I); weiters liegen kurze Mitteilungen vor über akzessorische Chromosomen (EHRENDORFER 1957, SCHNEIDER 1958) und über diverse Kreuzungen zwischen Sippen der gleichen Ploidie-Stufe (Yearb. Carnegie Inst. Wash. 48—56, 1949—1957).

Spontane Störungen der Pollenmeiose, vorzüglich bei Wildformen des *Achillea millefolium*-Komplexes, bilden den Gegenstand des vorliegenden Beitrages II (diploide Sippen) sowie der folgenden III (polyploide Sippen) und IV (quantitative Verteilung und Gegenüberstellung). Bei den Diploiden handelt es sich im wesentlichen um Defekte der Matrix und Spiralisierung, besonders aber um Brüche und Bruchfolgen: Fragmente, Multivalente und Brücken, Spindelstörungen, Restitutionskernbildung, Non-Disjunction, somatische Aneuploidie sowie um reduzierte Syndese mit Univalentbildung.

Vom phylogenetischen Gesichtspunkt gesehen mag die Analyse solcher Störungen bedeutungslos erscheinen, da zumindest aus den stärker gestörten Meiosen keine vitalen Gameten hervorgehen. Als Rechtfertigung sei festgestellt, daß aus einem Studium der leicht faßbaren Extremphänomene am Rande der Normalamplitude der Chromosomenreproduktion¹ wichtige Hinweise auf die weniger leicht faßbaren Normalprozesse der cytogenetischen Differenzierung gewonnen werden können. — Vom Gesichtspunkt der Erforschung des normalen Mitose- und Meiose-Ablaufes dürfte eine genauere Analyse solcher spontaner Störungsvorgänge und vor allem auch ihr Vergleich mit experimentell ausgelösten Störungen der Chromosomenreproduktion von Bedeutung sein. Damit ist eine Verbindung zur experimentellen Mutationsforschung hergestellt.

Aus den oben entwickelten Voraussetzungen ergibt sich folgende allgemeine Fragestellung für den vorliegenden Beitrag:

1. Sind die einzelnen Störungskomponenten miteinander zu einem charakteristischen Störungssyndrom korreliert?
2. Welche ursächlichen Zusammenhänge lassen sich dabei erkennen?
3. Welche Rückschlüsse auf die idiotypische Steuerung der Störungsprozesse und die populationsgenetische Bedeutung der Störungsträger sind möglich?

Nach einer Darstellung der speziellen Störungsverhältnisse bei den einzelnen diploiden Arten und einem ausführlichen Überblick über das Problem der spontanen Chromosomenaberrationen sollen diese Fragen im allgemeinen Teil einer Beantwortung nähergebracht werden.

In weiterführenden Beiträgen soll versucht werden, das phylogenetische Bild des *Achillea millefolium*-Komplexes abzurunden: Nach der Behandlung der

¹ Der Begriff der *Chromosomenreproduktion* ist in der vorliegenden Arbeit im weitesten Sinn verstanden und soll damit den gesamten mitotischen und meiotischen Formwechsel ebenso wie auch den eigentlichen Teilungsvorgang, die Replikation (= identische Reduplikation) der Chromosomen, umfassen.

Störungen bei den Polyploidien (EHRENDORFER 1959c: Beitrag III) können aus der quantitativen Gegenüberstellung mit dem Störungsbefund bei den Diploiden verschiedene phylogenetische Schlußfolgerungen gezogen werden (1959d: IV). Als Folgen der spontanen Chromosomenaberrationen finden sich bei diversen Diploiden akzessorische Chromosomen mit charakteristischem Verhalten und besonderen Funktionen (1959e: V). Den Abschluß der laufenden Beitragsreihe bildet der Versuch einer Synthese: Eine Darstellung der wichtigsten Mechanismen der Mikro-Evolution beim *Achillea millefolium*-Komplex auf Grund der vorliegenden Daten, neuer Kreuzungsergebnisse und der Analyse natürlicher Hybridssippen (1959f: VI).

Für großzügige Arbeitsmöglichkeiten bin ich Herrn Prof. L. GETTLER zu großem Dank verpflichtet. Frau Prof. E. WOESS möchte ich sehr herzlich danken für viele Ratschläge.

B. Material und Methodik

Die cytologisch analysierten Pflanzen standen teils am natürlichen Standort, teils unter klimatisch weitgehend ähnlichen Bedingungen im Versuchsgelände des Botanischen Gartens der Universität Wien. Die Kennzeichnung erfolgt mit Fundort und Fixierungsnummer bzw. mit Serien- sowie Individuennummer. Von allen Individuen wurden Herbarbelege aufbewahrt.

Die Fixierungen von Blütenköpfchen wurden in den Jahren 1955—1958, nur während der Hauptblütezeit (Juni/Juli), nur bei normalen Klimabedingungen und immer blockweise vorgenommen, so daß gleichzeitig und von der gleichen Stelle entnommene Proben auch bei Anwendung strengster Maßstäbe vergleichbar sind (nähere Angaben s. unten). Im übrigen zeigen vergleichende Untersuchungen, daß sich innerhalb einer Normalamplitude von Umweltveränderungen größere Verschiedenheiten im Meioseverhalten von ein und derselben Pflanze nicht ergeben.

Die Fixierung von zerkleinerten Blütenköpfchen erfolgte in Carnoy (4:3:1), als Färbemittel der Quetschpräparate wurde gesättigte Karminessigäure verwendet und mäßig erwärmt. Zur raschen Feststellung von mitotischen Chromosomenzahlen hat sich folgende Methode bewährt: Gut wachsende Keimlinge im Zwei- bis Vier-Blatt-Stadium kommen für 4 Std in 0,25%ige wäßrige Colchizinslösung; Wurzelspitzen und Vegetationspunkte werden nach Carnoy-Fixierung und KE-Färbung zu Quetschpräparaten verarbeitet. Bei Anwendung dieser Methode werden immer zahlreiche erste C-Mitosen angetroffen.

Bei der Anfertigung der Quetschpräparate wurde absichtlich nicht zu starker Druck angewandt, um die Möglichkeit der Entstehung von Präparationsartefakten auszuschließen. Die räumliche Anordnung der Elemente in den PMZ bleibt bei dieser Methode weitgehend erhalten. Dieser Umstand und die Notwendigkeit, die Gesamtheit der Elemente einer PMZ zu demonstrieren, veranlaßte, in der vorliegenden Arbeit von photographischen Wiedergaben Abstand zu nehmen.

Bei der Ausführung der Zeichnungen wurden aberrationsbetroffene Chromosomenelemente durch schwarze, Univalente und Univalentenhälften durch schraffierte und \pm normale Elemente durch weiße Flächendeckung gekennzeichnet.

C. Spezieller Teil

Bei den im folgenden genauer behandelten Arten *Achillea setacea* W. K. und *A. asplenifolia* VENT. handelt es sich um diploide ($2n = 18$) Basissippen, aus denen durch Hybridisierung und Genomverdopplung ein Teil der polyploiden Sippen des *Achillea millefolium* L.-Komplexes hervorgegangen ist. *A. setacea* ist eine Sippe kontinentaler, westasiatischer

bis osteeuropäischer Sandsteppen, die sich zumindest bis ins Wallis verfolgen läßt, *A. asplenifolia* dagegen stellt eine ausschließlich pannonische Sippe dar und besiedelt meist anmoorige Niederungswiesen vom Typus der Molinieten. Obwohl die beiden Arten im Kreuzungsexperiment durch starke, \pm kryptostrukturale Barrieren getrennt sind (mangelhafte Kompatibilität, Sterilität oder stark reduzierte Fertilität der F_1 usw.), ist im Gelände eine gewisse Introgression von Merkmalen der *A. setacea* in *A. asplenifolia* möglich gewesen. Derartige, \pm stark an *A. asplenifolia* angeäherte hybridogene Populationen (*A. roseo-alba* EHREND., 1959a) haben ihr Verbreitungsschwerpunkt vor allem in anthropogen bedingten Mähwiesen und Weiden der norditalienischen Tiefebene, wo reine *A. asplenifolia* fehlt. — *A. crithmifolia* W. K. steht zwar der Basis des *A. millefolium*-Komplexes nahe, ist aber offensichtlich nicht an der Entstehung von Polyploidien dieses Formenkreises beteiligt gewesen. — Dagegen ist aus den ebenfalls recht isoliert stehenden diploiden Sippen der *A. nobilis* L.—*A. odorata* L.-Gruppe und Elementen des *A. millefolium*-Komplexes die allotetraploide *A. virescens* (FENZL) HEIMERL entstanden. — Über allfällige Beziehungen der südeuropäisch-balkanischen *A. coarctata* POIR. und *A. tomentosa* L. sowie der isolierten *A. grandifolia* FRIV. zum *A. millefolium*-Komplex liegen noch keine endgültigen Befunde vor.

Weitere Einzelheiten mögen den Arbeiten EHRENDORFER (1953a, 1959f) entnommen werden.

1. *Achillea setacea*

Als Beispiel für den Ablauf einer normalen, ungestörten Meiose in den Pollenmutterzellen (PMZ) einer diploiden *Achillea* mag Abb. 1 a—c von *A. setacea* aus dem Burgenland, Kalvarienberg bei Neusiedl, dienen. — Bei *A. setacea*, ebenso wie bei den anderen untersuchten diploiden *Achillea*-Arten, treten sonst ungestörte Individuen auf, bei denen die Chiasma-Frequenz \pm gesenkt ist; bei solchen Pflanzen finden sich daher in einzelnen, im Durchschnitt in etwa 5% der PMZ Univalente. Chiasma- und Univalentenfrequenz zeigen unter sonst gleichartigen Bedingungen von Individuum zu Individuum Verschiedenheiten und sind offensichtlich idiotypisch gesteuert.

Individuen mit \pm starker Störung der Chromosomenreproduktion wurden besonders in einer *A. setacea*-Population im Wallis, ober Sion: Tourbillon, festgestellt. In der gleichen Population waren auch nicht und kaum gestörte Individuen vorhanden. Die Fixierungen erfolgten bei normalen Umweltbedingungen, bei allen Pflanzen gleichzeitig und unter gleichartigen Voraussetzungen. Erscheinungsbild, Kopplung und Abfolge der Störungen seien am Beispiel der stark gestörten Pflanze Sion-3 eingehender dargestellt.

Mäßig und stark gestörte PMZ liegen hier neben völlig normalen und ungestörten PMZ im gleichen Antherenfach. Als Ausdruck der Labilität der Störungsvorgänge sind vielfach gewisse graduelle Verschiedenheiten zwischen verschiedenen Blüten, Köpfchen und Infloreszenzzweigen festzustellen.

Besonders auffällig sind an gestörten PMZ die vom Pachytän bis zur frühen Anaphase I in zunehmendem Ausmaß in Erscheinung tretenen freien Fragmente¹. In Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Loslösung und wohl auch in Abhängigkeit vom Ein- bzw. Ausschluß bestimmter Organisatoren sind diese Fragmente im Meioseablauf mit der Rest-

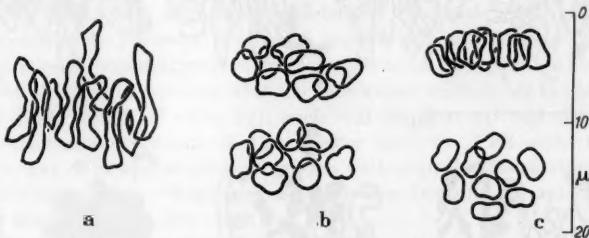


Abb. 1a—c. *A. setacea* (SUI 6325-105 und -111): Normalablauf der Pollenmeiose; a Meta I, b Ana I, c Meta II

masse der Chromosomen synchronisiert oder nicht. Bei Sion-3 sind die asynchronen, sehr frühzeitig abgespaltenen und schon in Metaphase I zu Mikronuclei umgewandelten Fragmente relativ selten und auf sehr stark gestörte PMZ beschränkt (Abb. 2f). Die Zahl der sich synchron verhaltenden Fragmente kann in den seltenen extrem „zerstääubten“ Meiosekernen bis gegen 50 betragen, übersteigt aber sonst gewöhnlich nicht die Zahl 5. In günstigen Fällen ist erkennbar, von welchen nunmehr asymmetrischen, heteromorphen Bivalenten die freien Fragmente stammen (Abb. 2a, b). Die Fragmente sind meist azentrisch und stellen relativ kleine, überwiegend terminal abgesplitterte Chromosomenstücke dar. Nur in den „zerstääubten“ Meiosekernen ist infolge der großen Bruchhäufigkeit die Grenze zwischen defizienten, zentrischen Bivalent- bzw. Univalent-Chromosomen und den kleinen, azentrischen Fragmenten z. T. verwischt. Hier ist dann auch infolge der starken meiotischen Chromosomenspiralisation und der irregulären Lageverhältnisse nicht immer mit Sicherheit festzustellen, ob ein bestimmtes Element zentrisch oder azentrisch ist (Abb. 2f).

Die zur Entstehung der Fragmente führenden Brüche sind chromosomal (bzw. isochromatidal) und müssen daher in der prämeiotischen

¹ In frühen Prophasen konnten keine etwa von prämeiotischen Mitosen her persistierende Fragmente gefunden werden.

Ruhephase oder der frühen meiotischen Prophase erfolgt sein. Das ist am frühen Zeitpunkt des Freiwerdens der Fragmente, an ihrer Größe, vor allem aber auch an ihrer häufigen Doppelstruktur ersichtlich. An fragmenttreichen „zerstäubten“ PMZ kann dabei beobachtet werden, daß die großen Fragmente vielfach aus 2 Elementen zusammengesetzt erscheinen, während die kleineren entweder durch dünne Chromatinfäden miteinander verbundene oder überhaupt freie und nur Lage-

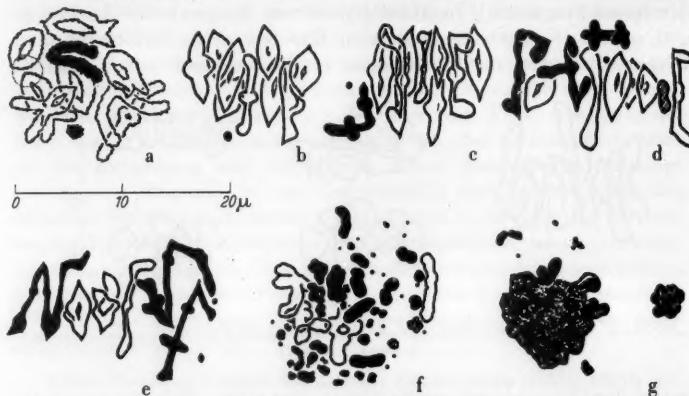


Abb. 2a-g. *A. selacea* (Sion-3): Störungen der Pollenmeiose; a Diakinese mit heteromorphem Bivalent und Chromosomenfragment; b Meta I mit freiem Chromosomenfragment; c Meta I mit verringelter Spiralsation der Chromosomen, 8 II + III + F; d Meta I, 3 III + 6 II + I + F; e Meta I mit verringrigerter Spiralsation der Chromosomen, 2 IV + III + 4 II + 2 F; f „zerstäubter“ Meiosekern in Meta I, 2 desynchronisierte Mikronukle; Korrosion der Chromosomen; g Restitionskern nach „zerstäubter“ Meta I

beziehung aufweisende Paare darstellen; die räumliche Isolierung unverbundener Fragmente ist bei kleineren Fragmenten im allgemeinen weiter fortgeschritten als bei größeren (Abb. 2f). Dieser Sachverhalt läßt sich mit einer höheren Reunionsrate der größeren im Vergleich zu den kleineren Isochromatidfragmenten deuten. Neben doppelstrukturierten und paarigen Fragmenten kommen einfache Chromosomenfragmente vor. Unvollständige Lösung der Chromosomenbrüche gibt sich durch vereinzelt Auftreten von achromatischen Zonen an Bivalent- und Univalentchromosomen zu erkennen. Gegenüber der großen Zahl der Chromosomen- bzw. Isochromatidfragmente sind einzelne Chromatidfragmente sehr in der Minderheit. Sie wurden vereinzelt, vor allem als angeheftete Fragmente in der Anaphase I (A I) beobachtet; die entsprechenden Defizienzen sind in der Anaphase II (A II) an den asymmetrischen Disjunktionspartnern sichtbar. Die Fragmente zeigen im allgemeinen eine große Persistenz und sind in den Pollenkörnern bis zum Auftreten der Pollenmitosen zu verfolgen.

Als Folge von Reunionen freier Bruchenden treten in Metaphase I (M I), A I und A II dizentrische Chromosomen, Brücken mit zugeordneten Fragmenten und Multivalentfiguren auf. Es ist bemerkenswert, daß dabei eine enge Korrelation mit dem Auftreten von freien Fragmenten festzustellen ist: mit zunehmender Frequenz nimmt auch die Frequenz der Brücken und Multivalente zu; in sonst ungestörten PMZ der aberrationslabilen Pflanzen sind Multivalentfiguren viel seltener, in ungestörten Nachbarpflanzen fehlen sie fast vollständig. Damit kann die Möglichkeit, daß es sich hier um Folgen von primärer Strukturheterozygotie handelt, weitgehend ausgeschlossen werden¹.

Bei Sion-3 sind einfache, symmetrische Bivalentbrücken zwischen homomorphen Partnern mit einem zugehörigen, zusammengesetzten, U-förmigen Doppelfragment in der A I weitaus am häufigsten (Abb. 3b); solche Brücken persistieren über die Interkinese vielfach bis in die A II und Telophase (T) II (Abb. 3c); auch A II-Brücken mit und ohne neu hinzutretende Fragmente sind in stärker gestörten PMZ nicht selten (Abb. 3c). Nur ausnahmsweise wurden auch doppelte Bivalentbrücken in A I beobachtet. (Wegen der mechanischen Deutung der verschiedenen Brücken vgl. S. 389—390.)

Das Auftreten von 3- und 4teiligen Chromosomenverbänden ist bei Pflanze Sion-3 nur in wenigen Fällen auf Multivalentbildung unter Beteiligung von überzähligen Chmosomen, meistens dagegen auf Folgen von Reunionen zwischen nicht-homologen Chromosomen zurückzuführen (Abb. 2c—e).

Relativ selten sind terminale, brückenartige Blockaden (Verklebungen) ohne Fragmente (in A I) und brückenartige Zerrungen des Centromers, wie sie bei vorzeitiger Trennung von nachhinkenden Univalenten in A I beobachtet wurden (Abb. 3a).

Parallel zum Auftreten von Bruch- und Reunionsfolgen kann in gestörten PMZ vielfach ein verringelter Grad der Spiralisierung mit Auftreten von dünneren und spindeligen Bivalents (bzw. Multivalents) festgestellt werden, wovon Abb. 2c und e eine gewisse Vorstellung geben. Weitere Störungen des Formwechsels betreffen vorzüglich die Matrix: So macht bei manchen PMZ die Oberfläche der Meiosechromosomen noch in M I einen „korrodierten“ Eindruck (Abb. 2f). Besonders in den frühen Meiosestadien ist Stickiness, also starke Tendenz zur Verklebung und Ausbildung von Chromatinfäden zwischen den Chromosomen verbreitet. In derartigen PMZ ist eine Detailanalyse der Chromosomenbrüche vielfach nicht mehr möglich.

¹ Prophaseanalysen, die eine endgültige Entscheidung bringen könnten, stoßen bei *Achillea* auf große technische Schwierigkeiten und konnten bei den infolge von Stickiness besonders unklaren chromosomenaberranten Formen nicht durchgeführt werden.

Besonders auffällig ist bei Sion-3, daß vor allem in stärker gestörten PMZ die Zahl der Chromosomen vermehrt ist: Mehrfach wurde mit völliger Sicherheit $2n = 18 + 1$, vereinzelt $+ 2$ und im Extremfall $+ 4$ gezählt (Abb. 2c—e). Da diese intra-individuelle Aneuploidie immer nur in einzelnen, gestörten PMZ auftritt, ungestörte Schwesterzellen aber immer nur die Normalzahl von $2n = 18$ aufweisen, kann die Ursache dafür nur in Verteilungsstörungen der Chromosomen während

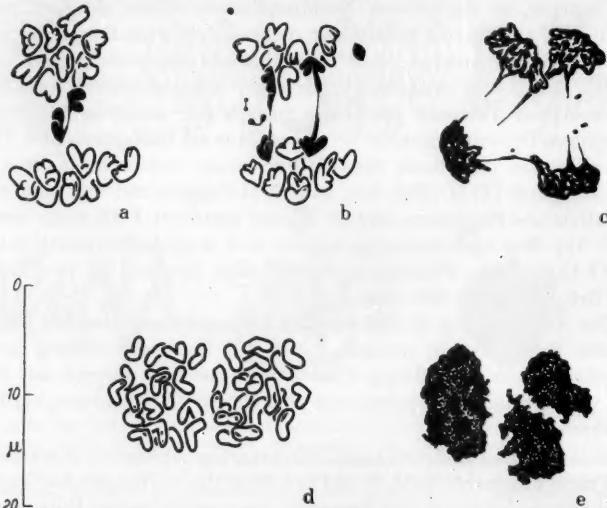


Abb. 3a—e. *A. setacea* (Sion-3): Störungen der Pollenmeiose; a Ana I, Verzerrung am Centromer eines verfrüh geteilten I; b Ana I, 2 einfache, symmetrische Bivalentbrücken mit dazugehörigen Doppelfragmenten, außerdem 2 freie Chromosomenfragmente, eines mit neozentrischer Aktivität; Telo II mit persistierenden Ana I- und Ana II-Brücken sowie zugehörigen Fragmenten; c „mitotisierte“ Ana II-Chromosomen nach Unterbleiben der Spindelbildung; d e Restitutionskernbildung nach Zusammenbruch von Ana II

der letzten prämeiotischen Mitosen gesucht werden. Die Korrelation zwischen somatischer Aneuploidie und spontanen Chromosomenaberrationen in bestimmten PMZ legt einen ursächlichen Zusammenhang dieser Störungen bei Pflanze Sion-3 nahe.

Ein Zusammenhang zwischen Bruchgeschehen und mangelhafter meiotischer Syndese ist bei Sion-3 nur angedeutet. Nur in den „zerstäubten“ Meiosekernen ist eine klare Zunahme der Univalentfrequenz gegeben (Abb. 2f).

Gegenüber den primären Aberrationen und Formwechselstörungen sowie der intra-individuellen Aneuploidie scheinen in den Meiosen der Pflanze Sion-3 Defekte des Spindelmechanismus nur als sekundäre

Folgeerscheinungen aufzutreten. In den extrem gestörten PMZ mit „zerstäubten“ Meiosekernen kommt es nicht zur Organisation einer Spindel sondern zur Bildung von irregulären Restitutionskernen (Abb. 2g).

In anderen Fällen ordnen sich die Bivalente z. T. nur mangelhaft in die Äquatorialplatte ein, die Spindeln können gekrümmmt sein, mit halbmondförmig angenäherten Spindelpolen usw. Bei PMZ, welche die A I und T I überstehen, resultieren infolge exzessiver Brücken- und Fragmentbildung in A II neuerlich Restitutionskerne (Abb. 3e). Nur in sehr vereinzelten Fällen ist der Zusammenbruch des Spindelmechanismus nicht mit Fragmentation und Brückenbildung gekoppelt. In solchen Fällen handelt es sich um PMZ aus Fächern mit starken Störungen; die Chromosomen zeigen verringerten Spiralisationsgrad und ein Aussehen ähnlich wie in der Mitose. Abb. 3d demonstriert eine derartige A II; hier ist die Spindelbildung unterblieben, die Chromosomen sind auseinandergefallen und sehen ± „mitotisiert“ aus.

Versucht man auf Grund der oben mitgeteilten Befunde die zeitliche Aufeinanderfolge der Störungen in den defekten PMZ von *A. setacea*: Sion-3 zu erfassen, so ergibt sich folgendes Bild:

1. Prämeiotische Mitosen: irreguläre Chromosomenverteilung.
2. Zwischen letzter prämeiotischer Mitose und meiotischer Prophase: Chromosomen-, später vereinzelt auch Chromatidbrüche, besonders in PMZ mit erhöhter Chromosomenzahl, darauffolgende Rekombinationen und Reunionen.
3. Späte meiotische Prophase bis Metaphase I: zunehmendes Auftreten freier Chromosomen- bzw. Isochromatidfragmente, Sichtbarwerden von Reunionenfolgen: Multivalente, dizentrische Chromosomen, Spiralisationsdefekte, Korrosion und Stickiness der Matrix.
4. Ana- bis Telophase I: Freiwerden vereinzelter Chromatidfragmente, Bivalentbrücken, Verklebungen, Spindeldefekte und Restitutionskernbildung in stark gestörten PMZ.
5. Meta- bis Telophase II: weitere Brücken mit und ohne Fragmente, weitere Spiralisations- und Spindeldefekte, z. T. mit Restitutionskernbildung.

Diese zeitliche Verteilung lässt sich auch an Hand der quantitativen Verteilung der Störungen in den Phasen der Pollenmeiose ablesen. Die folgende Tabelle ist das Ergebnis einer Analyse von 218 PMZ aus 2 Antheren der gleichen Blüte. Die PMZ sind nach dem Ausmaß der Störungen in 3 Gruppen geteilt: (1) nicht oder kaum gestört, keine freien Fragmente; (2) mäßig gestört, mit freien Fragmenten, Brücken, Multivalenten usw.; (3) stark gestört, mit zahlreichen freien Fragmenten, „zerstäubte“ Meiosekernе usw. Die relativ klare Trennmöglichkeit dieser Gruppen legt das Vorhandensein von entsprechenden Reaktionsschwellen im Störungsablauf nahe; die stufenweise Zunahme

der Störungsintensität ist intra-individuell und modifikativ bedingt. In den Phasen M I bis T I wurde weiter nach Funktion bzw. Zusammenbruch des Spindelmechanismus (Spi.) mit Restitutionskernbildung (Restk.) gegliedert. Die Angaben sind nach Meiosephasen gruppiert und in Prozenten abgefaßt, die tatsächlich festgestellten Zahlen entsprechender PMZ sind in Klammern beigegeben. Die Pfeile deuten die Entwicklungsrichtungen an.

Tabelle 1

	Pach. (27)	Diak. (17)	M bis T I (136)		M bis T II (38)	
			Spi. normal	Spi. defekt, Restk.	Spi. normal	Spi. defekt, Restk.
(1)	96,3% (26)	82,4% (14)	77,2% (105)		55,3% (21)	
(2)	3,7% (1)	17,6% (3)	9,6% (13)		15,8% (6)	28,9% (11)
(3)			10,3% (14)	2,9% (4) ¹	1	1

¹ Das Defizit an stark gestörten PMZ (III) in M II bis T II beruht offensichtlich auf einem „Steckenbleiben“ derartiger PMZ in der Interkinese.

Das Ausmaß der Gesamtstörungen ist bei *A. setacea*: Sion-3 nach der Tabelle mit 27,6% defekter PMZ anzugeben; nur bei 8,05% kann man von starken Störungen (3) sprechen; die übrigen PMZ und der aus ihnen hervorgehende Pollen ist offensichtlich weitgehend normal. Da sich auch schwach und mäßig gestörte PMZ weiterentwickeln, ist die Pollenfertilität der aberrationslabilen Pflanzen nur mäßig eingeschränkt.

2. *Achillea asplenifolia*

Die meiotischen Verhältnisse halten sich im gleichen Rahmen wie bei *A. setacea*. Bemerkenswert ist vor allem das Auftreten von stark heterochromatischen akzessorischen Chromosomen mit mitotischer Verteilungslabilität; darüber wird in einer folgenden Arbeit ausführlicher berichtet werden (EHRENDORFER 1959 e).

Nur bei 2 der 7 genauer analysierten Pflanzen aus dem nördlichen Burgenland, Raum Podersdorf—Weiden, konnten schwache Störungen der Chromosomenreproduktion festgestellt werden; hier kommen einzelne freie Fragmente und Anaphasebrücken vor. Die genaue Meioseanalyse einer Pflanze mit akzessorischen Chromosomen ergab keine Störungen der Chromosomenreproduktion. Drei Pflanzen zeigen mäßig reduzierte Syndese mit Univalenten in M I.

3. *Achillea roseo-alba*

Der Normalablauf der Meiose bei dieser hybridogenen Sippe entspricht durchaus den Verhältnissen bei *A. setacea* und *A. asplenifolia*. Ebenso wie bei der letzteren Art sind in mehreren Populationen Indi-

viduen mit akzessorischen Chromosomen angetroffen worden (EHRENDORFER 1959a, e). Übereinstimmend ist auch die idiotypische Steuerung der Chiasma-Frequenz. Bei 3 der daraufhin untersuchten 8 sonst ungestörten Individuen wurden unter gleichartigen Bedingungen in unterschiedlicher Häufigkeit 2, in Extremfällen sogar 4 ungepaarte Chromosomen gefunden (Abb. 4a). In A I teilen sich diese Univalente meist vorzeitig (Abb. 4b), bleiben in A II aber größtenteils ungeteilt und werden entweder zufallsgemäß verteilt oder als „laggards“ eliminiert,

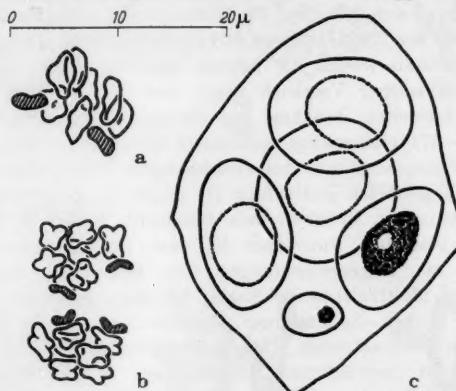


Abb. 4a—c. *A. roseo-alba* (Pontebba 2—17): Verhalten der Univalente in der Meiose; a Meta I, b Ana I, c Mikronukleus mit Zellwand in Tetradengruppe, entstanden aus nachhinkenden Univalentenhälften in Ana/Telo II

wobei es z. T. auch zur Bildung von Mikronuclei und eigenen Zellen kommen kann (Abb. 4c). Wenn in einzelnen Fällen eine zweite Teilung in A II zustande kommt, resultieren teilweise Verzerrungen im Centromer. Im Verhalten der Univalente ergeben sich also keine Unterschiede gegenüber den pentaploiden *Achillea*-Hybriden (SCHNEIDER 1958). Als Beleg für die Syndeseverhältnisse sei angeführt, daß eine Pflanze, bei der praktisch niemals Univalente festgestellt werden konnten, 46,7% Stab- und Kreuzelemente mit einem Chiasma und 53,3% Ringe mit 2 Chiasmata aufwies; bei Pflanzen mit Univalenten ist die Chiasma-Frequenz z. T. wesentlich niedriger.

Von 16 genau analysierten Pflanzen der *A. roseo-alba* konnten bei 5 ± starke Störungen der Chromosomenreproduktion festgestellt werden. Ebenso wie bei *A. setacea* ist auch hier das Nebeneinandervorkommen von ungestörten und gestörten Individuen die Regel, wie etwa in den Populationen Pontebba oder Grigna bei Lecco. Auch hier kann ein modifikativer Einfluß ausgeschlossen werden, da die Fixierung unter

gleichartigen Bedingungen im Botanischen Garten der Universität Wien erfolgten. Hervorgehoben werden muß, daß *keines* der 3 Individuen mit akzessorischen Chromosomen irgendwelche Störungen der Meiose aufwies; 2 dieser Individuen stammten aus der Pontebba-Population, in der auch gestörte Pflanzen festgestellt wurden.

Ebenso wie bei *A. setacea* Sion-3 ist selbst bei stark gestörten Pflanzen von *A. roseo-alba* der Meiose-Ablauf noch bei der Mehrzahl der PMZ normal. Ein Vergleich der Störungsintensität bei verschiedenen Individuen muß sich daher auf die Quantität der gestörten PMZ, besser aber noch auf die Amplitude des Störungsgeschehens stützen; als Markierungen müssen jeweils die extrem gestörten PMZ herangezogen werden. Ein solcher Vergleich zeigt, daß der modifikatorisch bedingten stufenweisen Zunahme der Störungen im Einzelindividuum (vgl. S. 373—374) eine analoge stufenweise Zunahme der idiotypisch festgelegten Störungsamplitude bei verschiedenen Individuum entspricht: Bei schwach gestörten Individuen (1) reicht die Streuungsamplitude nur bis zu einzelnen Brücken, freie Fragmente fehlen ± vollständig; bei mäßig gestörten Individuen (2) sind freie Fragmente bereits vorhanden, als Folgeerscheinungen von Reunionen sind einfache Brücken und Multivalente die Regel; bei stark gestörten Individuen endlich (3) reichen die extremen Abweichungen von Doppelbrücken, Auftreten von asynchronen Chromatinmassen und Restitutionskernbildung bis zu „zerstüberten“ Meiosekernen. — Im übrigen ist der Störungsablauf bei *A. roseo-alba* recht übereinstimmend mit den für *A. setacea* festgestellten Verhältnissen. Im folgenden liegt daher das Schwergewicht der Darstellung besonders auf gewissen Abweichungen und zusätzlich auftretenden Einzelkomponenten des Störungsablaufes. Die Daten beziehen sich größtenteils auf die Pflanzen Grigna 8—2, 7—9 und Ballabio 10—1.

Neben dem Auftreten von freien Fragmenten sind besonders bei Pflanze Grigna 8—2 asynchrone, relativ lockere und keineswegs pyknatisch aussehende Chromatinmassen bzw. Mikronuclei sehr auffällig (Abb. 5c, d; 6g, k). Ihre Isolierung erfolgt in der frühen Prophase; in keinem Fall konnte eine sichere Persistenz aus prämeiotischen Mitosen belegt werden. Mit Sicherheit können Cytomixis oder gar artifizielle Bildungen im Zuge der Präparation als Ursache für das Auftreten dieser Chromatinmassen ausgeschlossen werden. Derartige PMZ erreichen meist kaum die T.I. „Zerstüberte“ Meiosekern sind viel seltener als bei Sion-3 und konnten nur bei 3 von 500 PMZ (0,6%) beobachtet werden (Abb. 6k). Die Fragmentation erfaßt — ebenso wie bei *A. setacea* — meist die Chromosomenenden (Abb. 5a, b, h; 6c, k); die entsprechenden Bivalente sind asymmetrisch und heteromorph (Abb. 5d). Auch sonst gelten hinsichtlich Zeitpunkt der Brüche, Größe, Einfach-

und Doppelstruktur der Chromosomenfragmente sowie paarweiser Lagerung und Tendenz zur Reunion von Isochromatidfragmenten (Abb. 5b, 6k usw.) die gleichen Feststellungen wie für *A. setacea* (S. 370). Die Abfolge vom Auftreten der Achromasien bis zur Isolation der Fragmente, die sich ja hauptsächlich von der späten Prophase bis zur frühen MI abspielt, ist aus Abb. 6k mit der Darstellung einer sehr stark

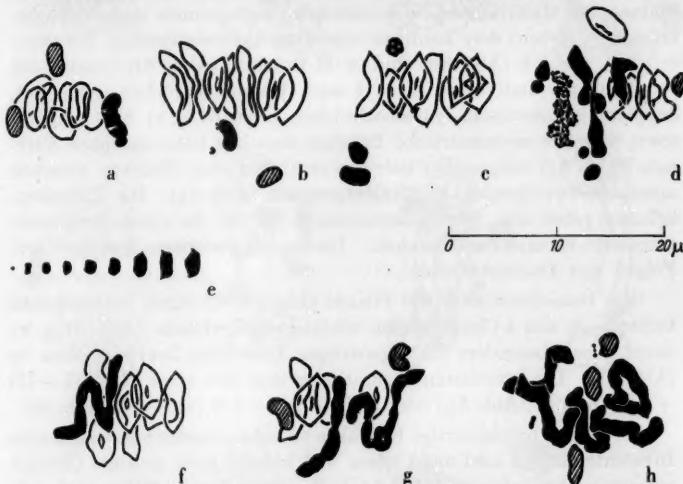


Abb. 5a—h. *A. roseo-alba* (Grigna 8—2): Störungen der Pollenmeiose, Meta I; a achromatische Stelle und angeheftetes Chromosomenfragment; 8 II + 2 I; b Univalent mit terminal abgesplittetem Isochromatidfragment; 9 II + 2 I + F; c verschieden große Chromosomenfragmente (aus Bivalenten) und asynchrone Mikronukleus; 8 II + 2 F + M-N; d heteromorphe Bivalente und frei Chromosomenfragmente, asynchrone Chromatinmasse; e freie Chromosomenfragmente aus verschiedenen PMZ; z. T. mit neozentrischer Aktivität der Enden; f—Multivalentbildung; z. T. zwischen Nicht-Homologen; f IV + 7 II; g IV + III + 4 II + 2 I; h 3 III + 3 I + 2 F

geschädigten „zerstäuften“ PMZ in Diakinese gut erkennbar. Besonderswert ist hier auch die intensive Fragmentation der Nukleolusorganisatoren¹. Unvollständige Brüche treten in MI als Achromasien und angeheftete Chromosomenfragmente in Erscheinung (Abb. 5a). Während der A I sichtbar werdende Chromatidfragmente sind ebenso wie bei *A. setacea* selten.

Ein bevorzugtes Auftreten von Brüchen an Univalenten liegt bei Pflanze Grigna 8—2 durchaus im Bereich der Möglichkeit (vgl. Abb. 5b, c, d, h; 6e). Im Gegensatz zu *A. setacea* Sion-3 ist hier keine deutliche Korrelation zwischen vermehrter Chromosomenzahl und Störungsrate in einzelnen PMZ festzustellen.

¹ Die diploiden Arten von *Achillea* haben 4 SAT-Chromosomen.

In der späten M I und A I ist eine terminale Zuspitzung und teilweise auch spindelparallele Ausrichtung vieler freier Fragmente festzustellen, was wahrscheinlich auf neozentrische Aktivität bestimmter Fragmentenden zurückzuführen ist (Abb. 5e).

Reunionen von Brüchen, wohl ausschließlich in der meiotischen Prophase, führen auch bei den gestörten *A. roseo-alba*-Pflanzen zur Bildung von Multivalenten, dizentrischen Chromosomen und Anaphasebrücken. Neben den häufigen einfachen symmetrischen Bivalentbrücken der A I (Abb. 6d) und A II-Brücken (Abb. 6i) wurden bei verschiedenen Individuen in A I auch Univalentbrücken (Abb. 6e), doppelte symmetrische Bivalentbrücken (Abb. 6f, g, h) und einfache sowie doppelte asymmetrische Brücken zwischen heteromorphen Partnern (Abb. 6g) festgestellt; teilweise entstehen auch Brücken zwischen auseinanderweichenden Multivalentgruppen (Abb. 6g). Die Univalentbrücken gehen aus „loop“-Chromosomen hervor, die durch Schwesterchromatid-Reunionen entstehen. Die asymmetrischen Brücken sind Folgen von Translokationen¹.

Sehr bezeichnend sind bei Pflanze Grigna 8—2 durch Translokation bedingte, 3 und 4 Chromosomen umfassende Verbände (Abb. 5f, g, h), unter denen besonders ein eigenartiger Dreierring hervorgehoben sei (Abb. 5h). Die extremsten Figurationen sind hier etwa IV + III + 4 II + 2 I ($2n = 17$, Abb. 5g) oder 5 III + 3 I + 2 F ($2n = 18$, Abb. 5h).

Terminale, brückenartige Kontakte zwischen auseinanderweichenden Bivalenten in A I sind nicht selten und können auch mehrere Chromosomenschenkel erfassen (Abb. 6a, b, f). Besonders auffällig sind subterminale und interstitielle Blockaden der Bivalenttrennung, die das Verbleiben der in Mitteilenschaft gezogenen Bivalente in der Äquatorialplatte zwischen den bereits getrennten übrigen Elementen erzwingen (Abb. 6f, g). Diese Bivalente erscheinen z. T. auffällig klein und weisen manchmal in proximaler Position blockierte Chiasmata auf, so daß Formen entstehen, wie sie sonst normalerweise nie vorkommen (vgl. Abb. 6g, Mitte rechts).

Defekte der Spiralisierung sind bei *A. roseo-alba* bisher nicht festgestellt worden. Stickiness der Matrix ist bei den stärker gestörten Pflanzen ± deutlich.

Intra-individuelle Aneuploidie in einzelnen PMZ bei Grigna 8—2 stimmt im Erscheinungsbild mit den Verhältnissen bei *A. setacea* Sion-3 überein, ist aber seltener. Neben häufigeren Plus-Abweichungen mit $2n = 19$ — 20 (Abb. 5b; 6d, e) kommen vereinzelt auch Minus-PMZ mit $2n = 17$ (Abb. 5g, f) vor.

¹ Eine ausführliche Interpretation der diversen Figurationen als Folge von Bruch- und Reunionsgeschehen folgt im allgemeinen Abschnitt (S. 388—390).

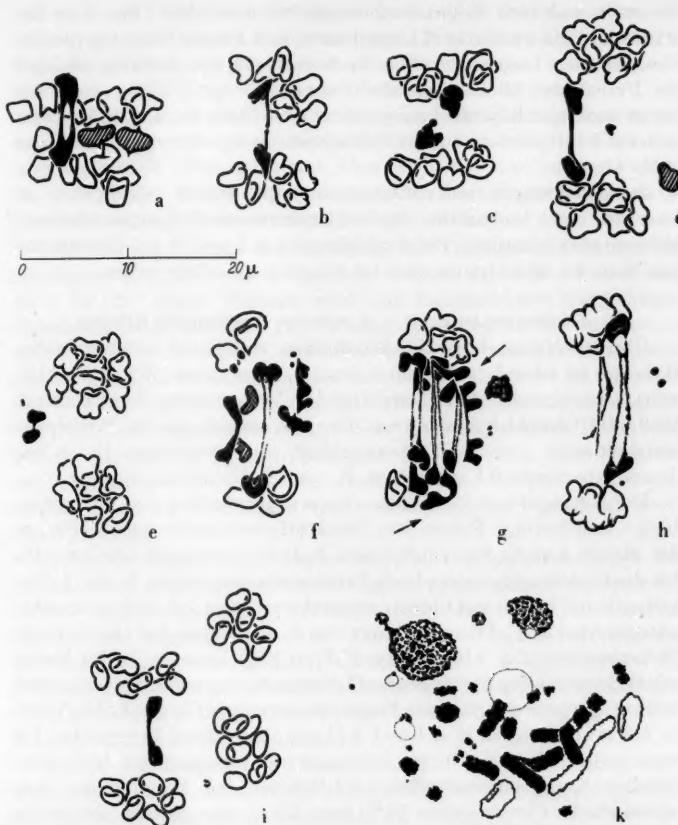


Abb. 6a—k. *A. roseo-alba* (Grigna 8—2: a, c, f—k; Grigna 7—9: b, Ballabio 10—1: d, e): Störungen der Pollenmeiose; a—h Ana (Telo) I; a doppelte terminale, brückenartige Blockade und 2 vorzeitig zur Teilung ansetzende I; b einfache terminale, brückenartige Blockade knapp vor der Trennung; c angeheftetes Chromatidfragment; d einfache symmetrische Bivalentbrücke mit Fragment, ein überzähliges I; e vorzeitiges Teilung eines überzähligen I: Univalentbrücke mit Fragment; f 2 Bivalente mit interstitieller, ein weiteres mit terminaler Non-Disjunction bzw. Blockade, doppelte symmetrische Bivalentbrücke, Fragmente; g subterminale Blockade, einfache und doppelte symmetrische Bivalentbrücke, asymmetrische Brücken (Pfeile) und asynchroner Mikronucleus; h doppelte Bivalentbrücke, Fragmente; i Ana II-Brücke mit Isochromatidfragment; k „zerstüberter“ Diakinesekern, Achromasien und Freiwerden der Fragmente, Fragmentation der SAT-Chromosomen (Nukleolen!), asynchrone Chromatinmassen

Im Vergleich zu *A. setacea* Sion-3 ist die Tendenz zur Reduktion der Syndese und damit zum gehäuften Auftreten von Univalenten bei

der stark gestörten Grigna 8—2 wesentlich deutlicher. Bei etwa der Hälfte der PMZ wurden in M I ungepaarte, in A I meist frühzeitig geteilte Chromosomen festgestellt (Abb. 5a, b, d, h; 6a, f). Auffällig ist, daß die Univalente, ähnlich wie die Fragmente (vgl. S. 378), öfters der Länge nach spindelparallel ausgerichtet sind (Abb. 5a, d, g, h) und erst in der A I verspätet die für die Teilung notwendige Querlage einnehmen (Abb. 4b, 6a).

Spindelstörungen und Mitotisierung der Meiose wurde bei *A. roseo-alba* nicht beobachtet. Restitutionskerne als Folge „zerstüberter“ Meiosen oder intensiver Brückebildung in A I und II mit Entstehung von Monaden und Dyaden sind bei Grigna 8—2 relativ selten.

4. *Achillea asplenifolia* × *A. setacea*: experimentelle Hybriden

Über die Meiose dieser den Wildformen weitgehend entsprechenden Hybriden ist schon kurz berichtet worden (SCHNEIDER 1958: 117—118), weitere ausführliche Darstellungen sind in Vorbereitung (EHRENDORFER 1959e, f). Obwohl hier sonst nur über Meiosestörungen bei Wildsippen berichtet wird, seien als Ergänzung doch einige wichtigere Daten von diesen experimentell hergestellten F_1 - und F_2 -Hybriden eingefügt.

Die Karyogramme der beiden Arten unterscheiden sich nur geringfügig. Regelmäßige Folgen von Strukturheterozygotie lassen sich aus der Meiose-Analyse von 17 diploiden F_1 -Individuen nicht ableiten. Die für die Kreuzungen verwendeten Parentalpflanzen weisen in der Pollenmeiose keine Folgen von Chromosomenaberrationen auf. 22 der daraufhin untersuchten 25 F_1 -Pflanzen führen von *A. asplenifolia* her akzessorische Chromosomen. Bei 8 Individuen ($7 F_1 + 1 F_2$) konnten in der Meiose schwache bis mäßige Störungen der Chromosomenreproduktion festgestellt werden: ganz vereinzelte freie Fragmente, terminale Chromatidblockaden in A I sowie Brücken in A I und A II mit (bzw. ohne) Fragmente. Die verschiedene Frequenz dieser Störungen bei verschiedenen Individuen gleicher Nachkommenschaften (A I-Brücken bei 2 Individuen ohne akzessorische Chromosomen 30% bzw. 2%!), eine gewisse somatische Labilität der Störungen und eine gewisse Pufferwirkung von akzessorischen Chromosomen (vgl. unten) sprechen sehr dafür, daß es sich dabei größtenteils um spontane Aberrationen und nicht nur um Folgen von struktureller Heterozygotie der F_1 -Hybriden handelt. Die Möglichkeit einer Beeinflussung von Aberrationen durch akzessorische Chromosomen ist durch eine gewisse Abhängigkeit der Aberrationen von der Zahl sowie somatischen Stabilität bzw. Labilität akzessorischer Chromosomen gegeben. Von 17 Individuen zweier reziproker F_1 -Serien und 5 Individuen einer zugehörigen F_2 -Serie, bei denen der Ablauf der Meiose genauer untersucht wurde, konnten Störungen der Chromosomenreproduktion nur bei den 2 Pflanzen ohne akzessorische Chromosomen

und bei 6 von 9 Pflanzen mit mäßig bis stark labiler Zahl dieser Chromosomen festgestellt werden. Bei den weiteren 11 Individuen mit \pm konstanten Zahlen von 2 bzw. 3 akzessorischen Chromosomen waren keinerlei Störungen gegeben (vgl. S. 395 und EHRENDORFER 1959 e).

Prämeiotische Veränderungen der Zahlen der Normalchromosomen wurde bei experimentellen *A. asplenifolia* \times *A. setacea*-Hybriden niemals festgestellt. Nur bei 2 (von über 300!) F_2 -Keimlingen war schon im embryonalen Gewebe bzw. in einzelnen Keimplingswurzeln infolge Mitosestörungen 1 Chromosom verlorengegangen.

Aufschlußreich waren die Ergebnisse der Chromosomenzählung bei 208 diploiden F_2 -Pflanzen; 6 von ihnen zeigten $2n = 18 + 1$ und eine $2n = 18 + 2$. Diese Pflanzen sind aus Gameten mit überzähligen Chromosomen entstanden. Die Ursache dafür liegt in der auch schon bei den Wildformen (S. 375 ff.) beschriebenen reduzierten Syndesefrequenz, die sich in mäßig verstärkter Weise auch bei den Hybriden im Auftreten von 2—4 Univalenten zu erkennen gibt. Die durchschnittliche Frequenz von PMZ mit Univalenten ist 10%; für EMZ liegen keine Werte vor. Da die aneuploiden F_2 -Individuen nur 3% erreichen, sind Zygoten mit überzähligen Chromosomen deutlich benachteiligt. — Entsprechende aneuploide Wildformen wurden bisher auf der Diploidstufe noch nicht gefunden.

Wenn die diploiden F_1 -Pflanzen mit Pollen polyplöider Sippen des *A. millefolium*-Komplexes bestäubt wurden, zeigte sich an der resultierenden Nachkommenschaft (95 Individuen), daß 70% der Eizellen diploid, also unreduziert waren. Der dabei wirksame cytologische Mechanismus ist noch ungeklärt. Obwohl bei den *A. asplenifolia* \times *A. setacea*-Hybriden auf der männlichen Seite noch keine Restitutionskernbildung beobachtet werden konnte, scheint ein solcher Vorgang bei den Eizellen im Bereich der Möglichkeit.

Nur in 1,35% der F_2 (3 Pflanzen von 222) kommt es durch Verdopplung der Chromosomenzahl zur Entstehung von Allopolyploidien mit der tetraploiden Chromosomenzahl $2n = 36$.

5. *Achillea crithmifolia*

Diploide Formen. Die cytologische Analyse von 7 Individuen aus balkanischen Populationen im Raume Peć-Priština, Jugoslawien (BA 6) und Kozani-Veria, Griechenland (BA 22) lieferte im wesentlichen ähnliche Ergebnisse wie bei den zuvor besprochenen Arten. An 2 Individuen wurden schwache bzw. mäßige Störungen der meiotischen Chromosomenreproduktion festgestellt: so etwa bei Pflanze BA 22—2 (60 PMZ) ver einzelte freie M I-Fragmente (7,3% der PMZ), A I-Brücken mit Fragmenten (5,3% der PMZ) und terminale Verklebungen in A I (5,3% der PMZ). Bei der sonst ungestörten Pflanze BA 6—3 waren in 7,0% der

PMZ in M I ungepaarte homomorphe Partner als Univalente festzustellen; in 2 anderen Individuen der gleichen Population wurden keine Univalente gefunden. — Als Folge von chromosomalen Umbauten tritt in 2 Pflanzen aus einer Population südlich Priština, bei Uroševac (fix. 16 und kult. HBV: Alpinum) ein heteromorphes Chromosomenpaar auf, das häufig ungepaart bleibt. In den prämeiotischen Mitosen zeigen diese Chromosomen eine bemerkenswerte Instabilität, so daß immer wieder einzelne PMZ auftreten, in denen eines oder beide dieser Chromosomen fehlen oder überzählig sind. Bei der sonst ungestörten Pflanze BA 6 — fix. 12 (Peč-Priština: Rudnik) — ist zum Normalsatz von 9 homomorphen Chromosomenpaaren ein entsprechendes, sehr verteilungslabiles Zusatzchromosom getreten. Damit sind Verhältnisse gegeben, die so eng an den Problemkreis der akzessorischen Chromosomen bei *A. asplenifolia* und ihren Hybriderivaten heranreichen, daß eine ausführlichere Behandlung in der entsprechenden Arbeit erfolgen soll (EHRENDORFER 1959e).

Triploide Form. Die autotriploide Pflanze BA 21—2 aus der diploiden Population Kozani-Veria zeigt eine interessante Kombination von Störungen der Chromosomenreproduktion mit solchen, die aus ihrer Polyploidie abzuleiten sind. Gegenüber den in der folgenden Arbeit (EHRENDORFER 1959c) zu behandelnden orthoploiden Sippen des *A. millefolium*-Komplexes ist vor allem der hohe Prozentsatz von Multivalenten hervorzuheben.

Eine Analyse von 11 PMZ in M I zeigte folgendes Resultat:

Trivalente	3	3	4	5	5	8	5	3	5	8	8
Bivalente	6	6	6	4	5	1	6	8	5	2	3
Univalente	5	5	5	4	2	1	2	4	4	2	1 (+ F)
2n . . .	26	26	27	27	27	27	29	29	29	30	31 (+ F)

Das ergibt ein Mittel von 5,2 Trivalenten pro PMZ. Quadrivalente wurden nicht beobachtet. Die Trivalente haben meist die Form von Ring + Stiel, daneben kommen 3strahlige und kettenförmige Elemente vor. Die Univalente zeigen in M I teilweise auffällig ringförmige Annäherung der Enden, was auf fehlerhafte Schenkelpaarung deutet (Abb. 7a). Sie teilen sich meist schon in A I (Abb. 7d, e). Trotz dem gegenüber den Bivalenthälften deutlich verstärkten Größenwachstum ist eine weitere Teilung in A II kaum möglich, wenn auch eine Zerlegung in Chromatiden vielfach schon klar erkennbar ist (Abb. 7g). Auffällig ist die oft deutlich spindelparallele Ausrichtung der Univalenthälften in A II. Infolge der Teilungsverzögerung hinken die Univalenthälften nach und werden in T II teils in die Tetradenkerne eingeschlossen, teils als Mikronuclei eliminiert.

Im einzelnen wurden folgende M II- und A II-Konfigurationen festgestellt¹:

Gruppe 1		Gruppe 2		2n (PMZ)
II/2	I/2	II/2	I/2	
11	4	11	4	26
11	4	11	4	26
12	3	12	3	27
11	4	12	4	27
11	4	12	4	27
10	2	15	2	27
13	2	13	2	28

Die Unregelmäßigkeit der Chromosomenverteilung auf die Tetradenkerne ist demnach beträchtlich. Rückregulierung auf die Diploidstufe, aber auch Aufregulierung auf die Tetraploidstufe innerhalb einer oder weniger Generationen scheinen möglich; dies um so mehr, als der Pollen trotz aller Störungen weitgehend normales Aussehen hat.

Aus den beiden Tabellen ergibt sich weiter eine besonders starke intra-individuelle Aneuploidie, die — wie bei den diploiden Sippen — in den prämeiotischen Mitosen Zustande kommen muß: 18 analysierte PMZ haben demnach Chromosomenzahlen:

2n	26	27	28	29	30	31
Anzahl der PMZ .	4	8	1	3	1	1

Bemerkenswert ist auch hier die verstärkte Tendenz zur Vermehrung der Chromosomenzahl, obgleich die Verminderung deutlicher hervortritt als bei den Diploiden.

Das Störungsbild der Chromosomenreproduktion bei BA 21—2 entspricht dem der diploiden Sippen. In M I wurden sowohl azentrische (Abb. 7c) als auch zentrische Chromosomenfragmente festgestellt. Auch angeheftete Chromatidfragmente kommen vor (Abb. 7d, an einem frühzeitig geteilten Univalent in A I). Die Fragmente sind im allgemeinen von mittlerer Größe und persistieren vielfach bis in die M II (Abb. 7f) und länger. PMZ mit zahlreichen Fragmenten oder gar „zerstäubte“ Meiosen wurden nicht beobachtet. In einzelnen PMZ treten heteromorphe Bivalente ohne zugehörige Fragmente auf (Abb. 7a). Andere Reunionsfolgen sind einfache und doppelte Bivalentbrücken in A I und etwas seltener A II-Brücken; auch terminale Verklebungen kommen in A I vor. Translokationsmultivalente sind als solche bei der triploiden BA 21—2 kaum erkennbar. Außer mäßiger Stickiness wurden keine

¹ Die Zahlenangaben beziehen sich auf Chromosomen (II/2 bzw. I) und Chromosomenhälften (I/2).

Störungen an der Matrix oder am Spindelmechanismus, auch keine Restitutionskernbildung beobachtet.

Aus der Analyse von über 100 PMZ aus A — T I + II ergibt sich folgende quantitative Verteilung der Störungen bei BA 21—2. Die

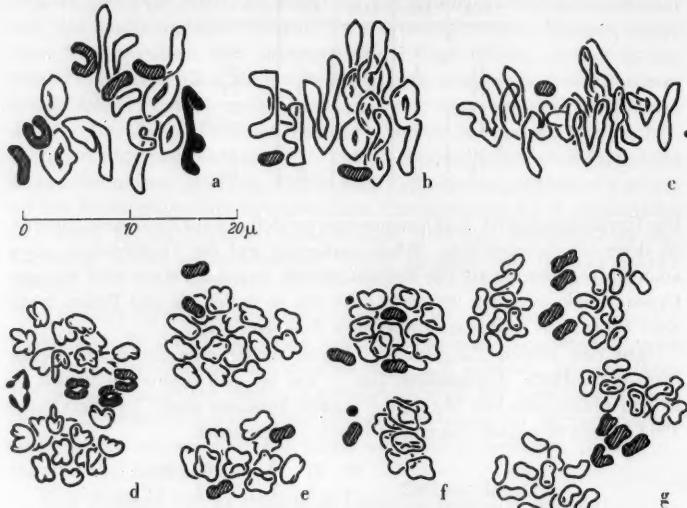


Abb. 7a—g. *A. crithmifolia*, triploide Form (Kozani-Varia, BA 21—2): Störungen der Pollenmeiose; a—c Meta I, somatische Aneuploidie; a 3 III + 6 II + 5 I, heteromorphes Bivalent; b 5 III + 6 II + 2 I; c 8 III + 3 II + 1 I + F; d Ana I, 4 vorzeitig geteilte I, eines davon mit angeheftetem Chromatidfragment; e sehr ungleiche Verteilung der Elemente in Ana I, 15 II/2 + 2 I/2 — 10 II/2 + 2 I/2; f Meta II mit Fragmenten und vorzeitig geteilten Univalenten (untere Platte unvollständig gezeichnet!); g Ana II mit je 4 nachhinkenden Univalentenhälften

Angaben sind in Prozenten ausgedrückt, die tatsächlich beobachteten Zahlen stehen in Klammer; verschiedene Störungen in ein und derselben PMZ wurden gesondert registriert:

Tabelle 2

	A I—T I (43)	A II—T II (73)
normal	69,8% (30)	71,2% (52)
nachhinkende I und I/2	9,3% (4)	20,6% (15)
freie, nicht zu Brücken gehörige Fragmente	9,3% (4)	1
Brücken	11,6% (5)	8,2% (6)

¹ Da die freien Fragmente aus M I—A I stammen und über die Interkinese hinweg eine gewisse Elimination erfolgt, wurden sie hier nicht nochmals gesondert erfaßt.

6. Weitere Arten

Stichprobenartige Meioseanalysen liegen ferner vor von den diploiden Arten *A. nobilis* (3), *A. odorata* (1), *A. tomentosa* (2), *A. coarctata* (1) und *A. grandifolia* (1). Alle untersuchten Individuen haben die Grundzahl n = 9. — Nur bei einem Beleg von *A. nobilis* aus dem Raume Würzburg (fix. 17) wurden mäßige bis starke Störungen der Chromosomenreproduktion mit Stickiness, Fragmentation, Brückebildung und zugeordneter Restitutionskernbildung sowie reduzierte Syndese festgestellt.

D. Allgemeiner Teil und Diskussion

1. Störungen der Chromosomenreproduktion: Abnormaler Formwechsel und Aberrationen

Die Reproduktion der Chromosomen ist ein Prozeß, dessen ± ungestörter Ablauf nur innerhalb einer gewissen Amplitude von extra- und intra-individuellen Bedingungen gewährleistet ist. Wird die Chromosomenreproduktion außerhalb dieser Amplitude gedrängt, so resultieren starke Labilität, Störungen und schließlich totaler Zusammenbruch. Diese Störungen können experimentell-modifikativ ausgelöst werden oder endogen bedingt sein: induzierte und spontane Chromosomenaberrationen. Die Amplitude der normalen Chromosomenreproduktion ist je nach Idiotypus und geprüftem Gewebe verschieden.

Bei den bisher untersuchten diploiden Achilleen finden sich Störungen der Chromosomenreproduktion spontan und idiosyncratisch gesteuert bei einem Teil der Individuen fast aller Populationen. Das Störungs-syndrom umfaßt besonders Stickiness, verringerte Spiralisation, Non-Disjunction, Fragmentation, diverse Reunionsfolgen sowie zugeordnete Spindelabnormitäten; die Störungen treten in labiler Ausprägung in prämeiotischen Mitosen und besonders vor und während der Pollenmeiose in Erscheinung.

Ein Vergleich mit der umfangreichen Literatur über Chromosomen-aberrationen zeigt, daß die Chromosomenreproduktion vor und während der Meiose ganz allgemein besonders labil ist (vgl. S. 391). Das Störungsbild von *Achillea* ist durchaus typisch. Weitgehende Übereinstimmungen ergeben sich vor allem mit Parallelfällen von spontanen Chromosomen-aberrationen in Pollenmeiosen von *Matthiola* (LESLEY und FROST 1927, PHILIP und HUSKINS 1931), *Zea* (BEADLE 1932d, 1937), *Hordeum* (MOH und NILAN 1954, NYBOM 1954), *Hosta* (AKEMINE 1940), *Secale* (MÜNTZING und PRAKKEN 1941¹), *Tulipa* (DARLINGTON und UPCOTT 1941b), *Trillium* (SPARROW und SPARROW 1950), *Scilla* (REES 1952¹), *Paeonia* (MARQUARDT 1952c¹, J. L. WALTERS 1956¹), *Paris* (HAGA 1953b¹), *Allium* (DARLINGTON und HAQUE 1955¹) und *Gasteria* (DARLINGTON und

¹ Mit ausführlicher Darstellung der Meiose-Irregularitäten.

KEFALLINOU 1957¹⁾). Außer diesen Fällen sind spontane Störungen der meiotischen Chromosomenreproduktion besonders bei Formen mit mangelhafter Genobalance, bei Hybriden und Apomikten sowie bei Inzuchtklinien festgestellt worden (vgl. S. 392—394). Prinzipielle Übereinstimmungen ergeben sich weiter mit zahllosen Fällen spontaner Chromosomenaberrationen in Mitosezyklen (vgl. S. 390). Ganz entsprechende Störungen erfolgen durch die Anreicherung von automutagenen Substanzen (d'AMATO und HOFFMANN-OSTENHOF 1956), vor allem aber auch durch die verschiedenartigsten experimentellen Eingriffe¹⁾: Allgemeine Veränderungen der Umweltbedingungen (HAGA 1937 c), Extremtemperaturen (MARQUARDT 1952 b), verschiedenste Chemikalien (OEHLKERS 1953 b, GLÄSS 1956, MOUTSCHEN-DAMEN und MOUTSCHEN-DAMEN 1958), ionisierende Strahlung (DARLINGTON und LA COUR 1953, SAUERLAND 1956, SAX 1957; Literatur bei SPARROW, BINNINGTON und POND 1958); allgemeinere Darstellungen über Chromosomenaberrationen finden sich bei KOLLER (1954) und SWANSON (1957). Die Übereinstimmungen im Erscheinungsbild der spontanen und experimentell ausgelösten Chromosomenaberrationen sind erstaunlich groß, die selektive Wirkung der sehr verschiedenenartigen mutagenen Agentien ist relativ beschränkt (GUSTAFSSON 1954; EHRENCBERG, GUSTAFSSON und WETTSTEIN 1957). Das System der Chromosomenreproduktion kann demnach an sehr verschiedenenartigen Punkten gestört werden, der Zusammenbruch folgt einem bestimmten Geleise.

a) Einzelkomponenten des Störungsbildes

Matrix. Abnorme Stickiness findet sich regelmäßig in der Meiose der gestörten diploiden Achilleen, allerdings bei verschiedenen Individuen in verschiedenem Ausmaß. Bruchfrequenz und Stickiness erscheinen dabei nicht streng korreliert, ähnlich wie bei den von M. S. WALTERS (1957) beschriebenen *Bromus*-Hybriden. Ganz allgemein nimmt die Intensität der Stickiness von der Prophase zur Metaphase ab. Das Erscheinungsbild reicht von der Ausbildung einzelner Chromatinfäden bis zu massiver Verklumpung. Stickiness erscheint als recht konstante Begleiterscheinung von Chromosomenaberrationen, sowohl von spontanen (BEADLE 1932 d, KLINGSTEDT 1937, MÜNTZING und AKDIK 1948, GAUL 1954 b, DARLINGTON und HAQUE 1955 usw.) als auch von experimentell ausgelösten (DAVIDSON 1957 usw.). Experimentelle Befunde legen nahe, daß es sich hier um Störungen des DNS-Metabolismus (KAUFMANN und DAS 1954), und zwar um Depolymerisationserscheinungen (MAZIA 1954, STEFFENSEN 1955) handelt.

¹⁾ Aus der ungeheuren Literatur können hier nur ganz wenige zusammenfassende Arbeiten genannt werden.

Non-Disjunction von Metaphase-Bivalenten und brückenartige Kontakte in A I lassen sich bei *Achillea* kaum als Matrixverklebung deuten (vgl. S. 388).

Nur in einzelnen Fällen wurde bei *Achillea* Korrosion der Metaphase-chromosomen festgestellt (S. 371). Entsprechende Parallelfälle werden etwa bei *Secale*- und *Bromus*-Hybriden beschrieben (GAUL 1954 b, M. S. WALTERS 1957) und im allgemeinen auf defekte DNS-Versorgung zurückgeführt.

Spiralisation. Abnorm dünne, spindelige M I-Chromosomen (S. 371) als Folge von mangelhafter Spiralisation sind bei diploiden, chromosomenreproduktiv gestörten Achilleen relativ selten. Entsprechende Parallelbeispiele wurden etwa von LESLEY und FROST (1927), KLINGSTEDT (1937), JOHNSON (1944), MÜNTZING und AKDIK (1948), DARLINGTON und HAQUE (1955) und M. S. WALTERS (1957) beschrieben. Tiefe Temperaturen, ionisierende Strahlung (DARLINGTON und LA COUR 1953 usw.) und andere experimentelle Eingriffe haben vielfach ähnliche Wirkung. Spiralisationsdefekte sind fast immer mit erhöhter Bruchrate gekoppelt und beruhen vielleicht auf Reduktion der Bindungskräfte in der DNS.

Hingewiesen sei auf die Bedeutung des Heterochromatins für die Spiralisation (EBERLE 1957). — Übermäßige Spiralisation und Kontraktion von Meiosechromosomen (vgl. z. B. MOH und NILAN 1954) wurden bei *Achillea* nicht festgestellt.

Centromer. Bei *Achillea* wurden bisher nur vereinzelt Verzerrungen am Centromer festgestellt (S. 371); sie sind als Folge von Anaphasetensionen auf nachhinkende, vorzeitig geteilte Univalente in A I bzw. häufiger auf Univalent-Spalthälften in A II mit Dehnung und Zerrung der noch unvollständig geteilten Centromerregionen zu deuten. Die Verhältnisse liegen damit ähnlich wie bei *Paeonia* (MARQUARDT 1952 c; dort Angaben über experimentell ausgelöste Parallelfälle).

Völlig anderer Natur sind Brüche („misdivisions“) im Centromer, die zur Entstehung von telozentrischen Chromosomen und nach Nichttrennung im Centromer zur Ausbildung von Isochromosomen führen (DARLINGTON 1939 b). Diese Vorgänge werden im allgemeinen als Ausdruck eines „schwachen“ Centromers aufgefaßt (LIMA-DE-FARIA 1949 b). Angesichts der immer wieder festgestellten Korrelationen in der Reproduktion des Centromers und der Chromatiden (spontan: DARLINGTON und UPCOTT 1941 b, MARQUARDT 1952 c, DARLINGTON und KEFALLINOU 1957; experimentell: DARLINGTON und LA COUR 1953) ist das Fehlen von Centromerdefekten bei aberrationslabilen Achilleen bemerkenswert. Offensichtlich sind Stabilität und Labilität der Centromerregion auch sippenspezifisch stark verschieden.

Blockade der Chromosomentrennung. Bei den bisher untersuchten diploiden Achilleen konnte Blockade der Chromosomentrennung in A I

vielfach festgestellt werden. Wahrscheinlich handelt es sich auch bei den fragmentlosen A II-Brücken teilweise um solche Blockaden. Die Blockaden sind entweder total oder führen zur Bildung von schließlich durchbrechenden Brücken; die Haftpunkte sind interstitiell, subterminal oder terminal (S. 378). Entsprechende meiotische Blockaden sind sowohl spontan (BEADLE 1932d, MÜNTZING und PRAKKEN 1941, MÜNTZING und AKDIK 1948, MARQUARDT 1952c, RUTISHAUSER 1956b, M. S. WALTERS 1957 usw.) als auch experimentell ausgelöst (DARLINGTON und LA COUR 1953, SAUERLAND 1956) aufgefunden worden. Da es sich um Punktreaktionen handelt und kein unmittelbarer Zusammenhang mit der allgemeinen Stickiness erkennbar ist, scheint die Deutung dieser Figurationen als Matrixverklebungen (= Kalymma-Agglutinationen: RESENDE und MANARETE 1951) zumindest im vorliegenden Material wenig wahrscheinlich. Möglich ist die Annahme von DARLINGTON und Mitarbeitern (vgl. DAVIDSON 1957, SHAW 1958), daß es sich um interstitielle, subchromatidale Bruchfolgen bzw. um terminale Chromatidkontakte handelt. Eine weitere Deutungsmöglichkeit ist die, daß in interstitieller oder terminaler Position (am Heterochromatin? Vgl. dazu unter anderem RUTISHAUSER 1956b und S. 398) durch mangelhafte Replikation der gepaarten Chromosomen die Trennung in Tochterchromosomen unterblieben ist, wodurch proximale Chiasmen im Zuge der Terminalisierung eine Blockade erfahren. Vielleicht ist in diesem Zusammenhang auch die z. T. feststellbare geringe Größe der blockierten Bivalente (vgl. Abb. 6f) von Bedeutung.

Brüche und Bruchfolgen. 1. Achromatische Stellen, angeheftete und freie Fragmente. Fragmentation ist die wesentliche Komponente im Störungsbild der Chromosomenreproduktion bei diploiden Achilleen. Die Reihe: achromatische Stelle — angeheftetes Fragment — freies Fragment fügt sich gut der „Lockstellenhypothese“ von MARQUARDT ein. Ähnlich wie bei *Scilla* (REES 1952), *Allium ascalonicum* (DARLINGTON und HAQUE 1955) und *Paeonia californica* (J. L. WALTERS 1956) tritt auch bei den untersuchten Achilleen die überwiegende Mehrzahl der Fragmente als freie Chromosomen- (bzw. Isochromatid-) Fragmente zwischen später meiotischer Prophase und MI in Erscheinung. Bei *Paeonia tenuifolia* (MARQUARDT 1952c), *Allium-* und *Secale*-Hybriden (EMSWELLER und JONES 1938, GAUL 1954b) und besonders bei *Bromus*-Hybriden (M. S. WALTERS 1957) ist das Schwergewicht dagegen in zunehmendem Maß auf erst in A I frei werdende Chromatidfragmente verschoben. Bei *Achillea* ist nur ein Bruchteil der Fragmente chromatidal und dann meist angeheftet.

In Übereinstimmung mit vielen anderen Fällen spontaner (MARQUARDT 1952c, RUTISHAUSER 1955, RUTISHAUSER und LA COUR 1956, J. L. WALTERS 1956, M. S. WALTERS 1957 usw.) und experimentell aus-

gelöster Fragmentation (vgl. REES 1953) und im Gegensatz zu den Verhältnissen bei *Paris* (HAGA 1953b) erfolgen die Brüche vorwiegend distal und subterminal, wofür Centromersteuerung bzw. distales Heterochromatin (wie es im Karyogramm von *Achillea* bei vielen Chromosomen ausgebildet ist) verantwortlich gemacht wird. Die Fragmente sind demnach meist klein und azentrisch. — Bei paarigen Isochromatidfragmenten ist eine Zunahme der Reunionsrate mit der Größe festzustellen (S. 370), analog zu Verhältnissen, wie sie schon für Fragmente in der Pollenmitose von *Tulipa* (DARLINGTON und UPCOTT 1941b) beschrieben wurden.

Die Fragmente zeigen teilweise — ebenso wie übrigens auch ein Teil der Univalente — mäßige neozentrische Aktivität, was in spindelparalleler Ausrichtung und Sichtbarwerden von Spindelansatzpunkten erkennbar wird (S. 378); dabei hat wohl auch das Heterochromatin eine gewisse Bedeutung (vgl. LIMA-DE-FARIA 1949b, M. S. WALTERS 1957).

Sehr auffällig ist bei stark gestörten Pflanzen und in extrem aberranten PMZ die Desynchronisierung von frühzeitig eliminierten Fragmenten bzw. Fragmentmassen (S. 376). Das Erscheinungsbild erinnert stark an Verhältnisse, wie sie für *Secale* und *Secale*-Hybriden beschrieben wurden (KATTERMANN 1933a, MÜNTZING und PRAKKEN 1941, GAUL 1954b). Dort soll es sich um Folgen prämeiotischer Cytomixis handeln; für *Achillea* kann diese Deutung kaum zutreffen, da entsprechende Chromatinmassen in frühen Prophasen nicht festgestellt werden konnten.

2. Heteromorphe Bivalente. Bei *Achillea* sind solche Elemente oft eindeutig als unmittelbare Folge von terminalen Defizienzen erkennbar (S. 369). Heteromorphe Bivalente können aber auch nach Translokationen und perizentrischen Inversionen entstehen (J. L. WALTERS 1952), wobei als Folge in A I auch Brückenbildung möglich ist (vgl. S. 390).

3. Multivalentbildung zwischen Nicht-Homologen. Derartige Konfigurationen sind bei stark aberrationslabilen diploiden Achilleen sehr bezeichnend (S. 371, 378ff.). Ihre Entstehung geht auf Austauschvorgänge zwischen Nicht-Homologen zurück, wobei Meiosepaarung zwischen den Austauschpartnern über eines bzw. beide der zugehörigen Homologen zur Bildung von (häufigeren) Tri- bzw. (selteneren) Quadrivalenten führt. Wegen Parallelbeispielen vgl. S. 390.

4. Anaphasebrücken. Die mechanische Deutung der bei chromosomenreproduktiv gestörten Achilleen sehr häufig auftretenden dizentrischen Chromatiden in A I und A II ist ohne Prophase-Analyse erschwert. Wenn man die brückenartigen aber fragmentlosen Anaphase I-Blokaden wegläßt (vgl. S. 387, 388), so ergeben sich folgende Typen:

a) Anaphase I-Brücken. Bei Doppelbrücken zwischen Bivalent-chromosomen, also zwischen homomorphen Partnern handelt es sich wohl ausschließlich um Chromosomen- (bzw. Doppelchromatid-)Reunio-

nen zwischen gepaarten Homologen. Wegen der geringen Chiasmafrequenz bei *Achillea* (je Chromosomenarm allermeist nur 1 Chiasma) kann die Möglichkeit von doppelten Inversionsbrücken ausgeschlossen werden. Bei den Einfachbrücken zwischen Bivalentchromosomen mit zugehörigen Fragmenten sind verschiedene Entstehungsmöglichkeiten gegeben. Wie schon EMSWELLER und JONES (1938), besonders aber HAGA (1953 b) feststellen, muß bei bruchlabilen Formen immer mit der Entstehung derartiger Brücken als Folge von U-förmigen Chromatidreunionen zwischen gepaarten Homologen gerechnet werden. Daß die den Brücken zugehörigen Fragmente öfters isochromatidale Doppelstruktur (S. 371 ff.) aufweisen, teilweise aber auch getrennt sind, kann als Beweis dafür gelten, daß zumindest ein Teil der einfachen A I-Brücken bei *Achillea* auf diese Weise zustande kommt; der restliche Anteil muß in bekannter Weise auf parazentrische Inversionen und Crossing-over zurückgeführt werden. A I-Brücken zwischen heteromorphen Partnern finden sich nur in stark gestörten PMZ und umfassen Einfach- und Doppelbrücken, z. T. zwischen auseinanderweichenden Multivalentgruppen (S. 378). Als mechanische Ursache kommen überwiegend Chromosomen- und Chromatidaustauschvorgänge (Translokationen) zwischen Nicht-Homologen in Frage. Univalentbrücken sind bei *Achillea* eine seltene Erscheinung (S. 378); sie gehen auf Schwesternchromatid-Reunionen (SR) in frühzeitig geteilten Univalenten zurück und führen zur terminalen Verkürzung des Chromosoms.

b) Anaphase II-Brücken. Sind zugehörige Fragmente vorhanden, so handelt es sich wohl meist um Folgen von SR innerhalb von Bivalentchromosomen; fehlen sie, so kommen vor allem auch SR aus zerrissenen A I-Brücken und Blockaden (vgl. S. 388) als Ursache in Frage.

Zum Vergleich mit der Fülle analoger Fälle von Translokationsmultivalenten und Anaphasebrücken muß hier ein Hinweis auf die wichtigste zusammenfassende Literatur genügen: DARLINGTON (1937a), M. S. WALTERS (1950, 1957), MARQUARDT (1952c) (spontane Aberrationen) bzw. DARLINGTON und LA COUR (1953) und LEA (1955) (induzierte Aberrationen).

b) Dynamik und Amplitude der Störungsphase

Spontane Chromosomenaberrationen sind in recht auffälliger Weise auf bestimmte Phasen der Individualentwicklung und Gewebedifferenzierung konzentriert. Bei der Samenkeimung ist ganz allgemein eine Zunahme der spontanen Aberrationen mit zunehmendem Samenalter und eine Abnahme mit fortschreitender Gewebedifferenzierung festzustellen (NICHOLS 1941, KATO 1955). Als auslösendes Agens kommen dabei vor allem automutagene Stoffwechselprodukte in Frage (D'AMATO und HOFFMANN-OSTENHOF 1956). Eine weitere Konzentration von

spontanen Aberrationen ist in der reproduktiven Phase gegeben: in den prämeiotischen Mitosen (vgl. S. 391), in der Meiose (vgl. S. 385), in den Pollenmitosen (GILES 1940a, 1941a; DARLINGTON und UPCOTT 1941b, SPARROW und SPARROW 1950 usw.), im Tapetum und Endosperm (BROCK 1955, RUTISHAUSER 1956b, c usw.). In den verschiedenen Abschnitten dieser Phase dürfte vor allem die Koppelung von komplexen Differenzierungsvorgängen mit Veränderungen im DNS-Stoffwechsel (SERRA 1947, BRACHET 1957) eine vermehrte Labilität der Chromosomenreproduktion bedingen; dazu kommen noch die intensive, aber zeitlich begrenzte physiologische Aktivität und die teilweise anorthoploide Struktur von Tapetum und Endosperm.

Besonders auffällig ist bei den Störungen der Meiose diploider Achilleen die extreme intra-individuelle Labilität des Störungsausmaßes. Daß hierfür physiologische Gradienten verantwortlich sein müssen, zeigen etwa die Angaben von REES (1952) und DARLINGTON und HAQUE (1955) über die Abhängigkeit des Störungsausmaßes von der Lage der PMZ im Pollenfach. Noch extremere Verhältnisse sind bei zweikernigen PMZ von *Avena* (HOLDEN und MOTA 1956) und *Antirrhinum* (RIEGER und MICHAELIS 1958) gegeben, wo der eine der Schwesterkerne Chromosomenbrüche und Degeneration, der andere Normalverhalten zeigt; diese Verhältnisse können nur durch Differentialsteuerung des Plasmas auf engstem Raum bedingt sein.

Eindeutige Belege für spontane Fragmentation in prämeiotischen Mitosen, wie sie aus Antheren (MÜNTZING und PRAKKEN 1941, REES 1952, 1955; DARLINGTON und HAQUE 1955) und Ovulargewebe (KURABAYASHI 1952a) angegeben werden, liegen bei *Achillea* bisher nicht vor. In frühen Prophasen konnten hier bisher keine freien Fragmente oder Mikronuclei festgestellt werden, doch belegt die unregelmäßige Chromosomenverteilung vor der Meiose und die intra-individuelle Aneuploidie in den PMZ auch für *Achillea* die physiologische Labilität dieser Phase. Auch die Röntgenempfindlichkeit der prämeiotischen Mitosen ist besonders hoch (SAUERLAND 1956).

Auf Grund des Überwiegens von Chromosomen- bzw. Isochromatid-fragmenten und -reunionen sowie wegen des Vorkommens von Chromatid-reunionen zwischen gepaarten Homologen muß geschlossen werden, daß die Brüche und darauffolgenden Reunionen nach der letzten prämeiotischen Mitose erfolgen, und zwar hauptsächlich vor und während der prophasischen Chromatidverdopplung der Meiose. Dieses zeitliche Zusammenfallen mit der kritischen Vorbereitungs- und Hauptphase der meiotischen DNS-Reduplikation¹ und des Crossing-over ist bemerkenswert und findet sich bei vielen Fällen spontaner Chromosomen-

¹ Man vergleiche dazu auch die entsprechenden experimentellen Daten von SPARROW (1951), THODAY (1954) und SAUERLAND (1956).

brüche¹. — Auf die weitere zeitliche Aufeinanderfolge der zugeordneten Störungen von den späteren Prophasen bis zur Tetradenbildung wurde bereits hingewiesen (S. 373).

Die Ansätze zu einer quantitativen Erfassung der Aberrationen bei *Achillea* lassen gewisse Rückschlüsse zu auf eine etappenweise Zunahme der Intensität der Störungen beim Vergleich verschiedener PMZ im Einzelindividuum (S. 373) bzw. beim Vergleich des Störungsausmaßes verschiedener Individuen (S. 376). Der ersten Alternative entsprechende Verhältnisse schildern auch DARLINGTON und UPCOTT (1941 b) sowie SPARROW und CHRISTENSEN (1950). Diese Verhältnisse sind offenbar auf Schwellenreaktionen im Kern-Plasmasystem zurückzuführen und können vielleicht folgendem Etappen zugeordnet werden: normal bis zu lokaler Bruchlabilität (Phase 1), Schweregewichtsverschiebung von Restitutionen zu Reunionen (Phase 2) und schließlich Zusammenbruch der Reunionsfähigkeit und der Chromomerenbindungen (Phase 3). Im Zusammenhang mit dem Versuch einer derartigen Deutung der Störungsphasen sei hingewiesen auf die für effektive Bruchauslösung notwendigen „Nachbareffekte“ (MÜLLER 1956) (1), auf die relative Unabhängigkeit von Bruch-Restitutionsvorgängen einerseits und Bruch-Reunionsvorgängen andererseits im Experiment (LEA 1955, SWANSON 1957) und auf die vom Diplotan zur M I stark abnehmende Reunionsfähigkeit (DESCHNER und SPARROW 1955) (2). Phase 3 ist im speziellen Teil als „zerstäubt“ beschrieben worden; entsprechende Extremstörungen finden sich spontan (HAGA 1937c, REES 1952, MARQUARDT 1952c, J. L. WALTERS 1956) und lassen sich durch Beeinflussung der Nukleoproteid-Makromolekülbindingen auch experimentell herbeiführen (MAZIA 1954).

c) Idiotypische Steuerung der Störungen

Die Vielfalt der experimentellen Eingriffe, durch welche Störungen im Formwechsel und der Reproduktion der Chromosomen ausgelöst werden können, läßt es verständlich erscheinen, daß auch bei den spontanen Störungen in analoger Weise sehr verschiedenartige idiotypische Auslösemechanismen mit verschiedenartigen Angriffspunkten wirksam werden. Überblickt man die bisher bekannten Fälle spontaner Störungen der Chromosomenreproduktion, so fällt eine deutliche Konzentration bei Gattungs- und Arthybriden auf. Bei höheren Pflanzen wären etwa zu nennen diploide Hybriden von *Allium* (EMSWELLER und JONES 1938) und *Tradescantia* (GILES 1940a, 1941a), eine Gattungshybride der *Compositae-Cichorieae* mit verschiedener Chromosomengrundzahl

¹ Das Überwiegen von Chromatidfragmenten bei einigen Fällen spontaner Aberrationen (S. 388) bedeutet keineswegs mit Notwendigkeit ein späteres Einsetzen der Bruchvorgänge, sondern kann ebensogut auf späterem Einsetzen der Restitutions- bzw. Reunionsvorgänge beruhen (vgl. dazu auch SAUERLAND 1956).

der Ausgangssippen (ONO 1956¹), polyploide Hybriden innerhalb der *Gramineae-Hordeae* zwischen den Gattungen *Secale*, *Triticum*, *Agropyron*, *Elymus* und *Hordeum* (KATTERMANN 1933a, LILJEFORS 1936, COOPER und BRINK 1944, STEBBINS und SINGH 1950, GAUL 1954b) und bei *Bromus* (M. S. WALTERS 1950, 1957), triploide Hybriden von *Gladiolus* (JONES und BAMFORD 1942) und *Avena* (HOLDEN und MOTA 1954) und Hybrid-Endosperme bei *Paris* und *Trillium* (RUTISHAUSER 1955¹, 1956b¹; RUTISHAUSER und LA COUR 1956¹) sowie bei *Lilium* (BROCK 1954), ferner als zoologische Beispiele etwa *Triton*- und Heuschreckenhybriden (BOEHRINGER 1938¹, KLINGSTEDT 1937). — Auch bei unseren experimentellen *A. asplenifolia* × *A. setacea*-Hybriden (S. 380) ist eine gewisse positive Beeinflussung der Rate und Intensität der Aberrationen als Folge der Hybridenatur erkennbar.

Die Fälle von spontanen Chromosomenaberrationen bei Hybriden von Sippen mit verschiedener Chromosomenzahl leiten über zu einer 2. Gruppe, bei der verstärkte Störungen der Chromosomenreproduktion nur mit Haploidie (RIEGER 1958) bzw. Anorthoploidie, etwa Triploidie (McCLINTOCK 1929a; LESLEY und LESLEY 1929; GILES 1940a, 1941a) gekoppelt sind. Chromosomenaberrationen entstehen bei solchen Formen besonders durch illegitime Paarung und Crossing-over (McCLINTOCK 1933, SEARS 1939a, LOVE 1940b). — Zu dieser Kategorie von aberranten Formen kann auch unsere autotriploide *A. cirthmifolia* (S. 381) gestellt werden. — Erhöhte spontane Bruchraten wurden ferner im Endosperm bei Anwesenheit von überzähligen Normalchromosomen (BROCK 1955) bzw. akzessorischen Chromosomen (RUTISHAUSER 1956b²) und an einem bestimmten Chromosom einer triploiden Hybride (HÄKANSSON 1950) beobachtet.

Spontane Störungen der Chromosomenreproduktion finden sich ferner bei vielen Apomikten, die ja meist hybridogen entstanden und vielfach anorthoploid oder aneuploid sind und die durch derartige Störungen keine Fertilitätseinbußen erleiden (vgl. dazu etwa BERGMANN 1935, GENTCHEFF und GUSTAFSSON 1940b und die zusammenfassende Darstellung von GUSTAFSSON 1946/47).

Ganz allgemein wurde bei chromosomenaberranten Hybriden und Formen mit mangelhafter Genombalance festgestellt, daß selbst Schwesternpflanzen starke Unterschiede im Ausmaß der Störungen aufweisen, wofür nur eine Abhängigkeit der Störungsintensität von der Erbkonstitution verantwortlich sein kann (vgl. dazu etwa M. S. WALTERS 1957³).

¹ Ausschließliche oder überwiegende Fragmentation der väterlichen Chromosomen im fremden mütterlichen Plasma der F_1 .

² Über gegenteilige Pufferwirkung überzähliger Chromosomen vgl. S. 395.

³ Man vergleiche dazu auch die intra-individuelle Steigerung der Bruchfrequenz in aneuploiden PMZ von *A. setacea* Sion-3 (S. 372) im Vergleich zu den ± neutralen Befunden bei *A. roseo-alba* Grigna 8—2 (S. 377).

Hybridität und mangelhafte Genombalance wirken also in bestimmten Fällen nur als „Verstärker“ von idiotypischen Störungsfaktoren. Damit in Übereinstimmung steht die Tatsache, daß spontane Chromosomenaberrationen vielfach nur durch genische (bzw. auch plasmatische) Steuerung ausgelöst werden. Einfache, meist rezessive Allele sind etwa bei Stickiness von Mais (BEADLE 1932d, 1937), bei *Hordeum* (MOH und NILAN 1954, NYBOM 1954), bei *Matthiola* (LESLEY und FROST 1927, PHILP und HUSKINS 1931) und bei *Lathyrus odoratus* (UPCOTT 1937 b) festgestellt worden. Komplexer sind das *Ac-Ds*- (bzw. Modulator-)System beim Mais, wo eine lokalisierte Bruchsteuerung über bestimmte Heterochromatin-Loci erfolgt (MCCLINTOCK 1953, 1956) sowie Bruchvorgänge im *wrc*-Chromosom von *Drosophila* (HINTON 1957). Polygen gesteuert ist die Bruchabilität an einem bestimmten Chromosom einer *Secale*-Linie (REES und THOMPSON 1955). Bei Allogamen kommt es durch Inzucht zur Anhäufung genetischer Steuerfaktoren für Chromosomenaberrationen und korrelierte Störungen; je nach dem Ausgangsmaterial ist dabei Intensität und Charakter des Störungsbildes verschieden: *Secale* (LAMM 1936; MÜNTZING und AKDIK 1948; REES 1955, 1957), *Alopecurus* (JOHNSON 1944a), *Bromus* (NIELSEN 1956) u. a.

Die idiotypische Steuerung der Chromosomenaberrationen erfolgt anscheinend meist durch \pm direkte Beeinflussung der Chromosomenreproduktion, seltener \pm indirekt und unter gleichzeitiger Desynchronisierung der Meioseprozesse (UPCOTT 1937 b, GENTCHEFF und GUSTAFSSON 1940 b, REES 1952, DARLINGTON und HAQUE 1955).

Für die besprochenen diploiden Arten von *Achillea* kann zusammenfassend festgestellt werden, daß in allen näher daraufhin untersuchten Populationen neben normalen Individuen auch solche mit spontanen Chromosomenaberrationen und zugeordneten, aber nicht mit Desynchronisierung im Zusammenhang stehenden Meioestörungen vorkommen (27,9%!). Die Intensität des Störungsbildes *unter gleichen Umweltbedingungen* ist von Individuum zu Individuum stark verschieden. Bei experimentell hergestellten Hybriden finden sich solche Abstufungen der Störungsintensität selbst bei Schwesternpflanzen. Daraus sind folgende Schlußfolgerungen bezüglich der idiotypischen Steuerung der Meioestörungen bei diploiden Achilleen möglich:

1. Formwechsel und Reproduktion der Chromosomen in der generativen Phase können durch idiotypische Faktoren \pm direkt und verschieden stark gestört sein.
2. Die Störungsfaktoren werden — zumindest bei den diploiden Wildpopulationen — ohne Beteiligung unausgeglichenener Genombalance oder unmittelbar vorhergehender Hybridisierung wirksam.
3. Bei experimentellen Hybriden ist die Wirkung der Störungsfaktoren gegenüber den Parentalpflanzen verstärkt.

4. Die Störungsfaktoren sind nicht ausschließlich plasmatisch sondern überwiegend oder ausschließlich genisch (bzw. kryptostrukturrell) bedingt.

5. Die Abstufungen der Störungsintensität machen eine genetisch \pm komplexe Wirkungsweise der Störungsfaktoren wahrscheinlich.

6. Die Störungsfaktoren sind als „Mutatogene“ Normalbestandteile des Genreservoirs der Populationen diploider Achilleen.

Als Gegensatz zu den Faktoren, welche Chromosomenaberrationen fördern, soll abschließend kurz auf das mögliche Vorhandensein von Pufferfaktoren hingewiesen werden. Bei den untersuchten Arten von *Achillea* sind im Hinblick auf allfällige Zusammenhänge mit stark heterochromatischen akzessorischen Chromosomen (EHRENDORFER 1959 e) folgende Daten anzuführen: 1. Von 43 genauer analysierten Individuen diploider Wildformen wurden bei 12 (27,9 %) Chromosomenaberrationen festgestellt. Bei 7 Individuen (16,3 %) mit akzessorischen Chromosomen aus dem gleichen Material fehlen Aberrationen. 2. Bei 22 F_1 - und F_2 -Pflanzen aus *A. asplenifolia* \times *A. setacea* (davon 2 ohne und 20 mit akzessorischen Chromosomen) finden sich schwache bis mäßige Aberrationen nur bei den beiden Pflanzen ohne akzessorische Chromosomen und bei 6 von 9 Pflanzen mit mäßig bis stark labiler Zahl von akzessorischen Chromosomen. 11 Individuen mit \pm stabilen Zahlen von 2 (bzw. 3) akzessorischen Chromosomen zeigen keine Aberrationen (vgl. S. 380). Wie in der oben angekündigten Arbeit gezeigt werden soll, sind in dieser experimentellen Hybridpopulation verschiedene cytologische, genetische und selektive Faktoren wirksam, um Individuen mit derartigen stabilen Zahlen (besonders 2) von akzessorischen Chromosomen zu fördern. — Auf Grund dieser Daten darf wohl vermutet werden, daß bei *Achillea* stark heterochromatische akzessorische Chromosomen in stabiler Zahl eine gewisse Pufferwirkung gegen Störungsfaktoren der Chromosomenreproduktion ausüben, wobei vielleicht das Balancesystem Eu-/Heterochromatin¹ beteiligt sein könnte. — Einen analogen Fall der Pufferwirkung eines überzähligen, stark heterochromatischen Nukleolenchromosoms gegen Röntgenauslösung von Aberrationen beschreibt LA COUR (1953); weitere entsprechende Daten und Belege für den positiven Einfluß überzähliger heterochromatischer Nukleolusorganisatoren auf die Restitutionsrate bringt McLEISH (1955). Hingewiesen werden muß allerdings auch auf scheinbar entgegengesetzte Wirkung von akzessorischen Chromosomen im triploiden Endosperm von *Trillium* (RUTIS-HAUSER 1956 b).

¹ Von Bedeutung sind in diesem Zusammenhang auch die Angaben von LONGLEY (1938) und LIN (1955) über die Relation von akzessorischen Chromosomen und heterochromatischen „knobs“ bzw. Nukleolengröße und RNS-Gehalt bei Mais.

2. Spindelstörungen und Restitutionskernbildung

Spindelstörungen spielen in der Pollenmeiose der untersuchten diploiden *Achillea*-Arten nur eine sehr untergeordnete Rolle. Sie treten als Folge von allgemeinem zellphysiologischen Zusammenbruch nur in extrem aberrationslabilen Pflanzen und hier wiederum fast ausschließlich in PMZ mit starker Fragmentation auf (S. 372). Der Gegensatz zwischen diesen seltenen, abhängigen, „sekundären“ Spindelstörungen bei den Diploiden und den relativ häufigen, ± autonomen, „primären“ Spindelstörungen bei den Polyploiden, wo Chromosomenaberrationen praktisch vollständig fehlen (EHRENDORFER 1959 c) muß schon hier herausgestellt werden. — Aus der Fülle ähnlicher „sekundärer“ Fälle sei etwa auf die Koppelung von spontanen Aberrationen mit Spindelabnormitäten bei Pflanzen (HAGA 1937 c, MÜNTZING und AKDIK 1948, REES 1952, DARLINGTON und HAQUE 1955, BROCK 1955, M. S. WALTERS 1957) und Tieren (KLINGSTEDT 1939) sowie auf entsprechende Parallelen bei experimenteller Bruchauslösung (DARLINGTON und LA COUR 1953) hingewiesen.

Mitotisierung der Meiosechromosomen — bei *Achillea* nur ganz vereinzelt als Folge von Desynchronisierung bzw. Ausfall des Spindelmechanismus beobachtet (S. 373) — ist besonders bei Apomikten häufig (vgl. dazu etwa BERGMANN 1935, GENTCHEFF und GUSTAFSSON 1940 b).

Die Restitutionskernbildung in den Pollenmeiosen ist bei diploiden Achilleen ausschließlich als Folge von extremen Bruchstörungen in Diakinese bis M I bzw. als Folge exzessiver Brückebildung, Anhäufung von „laggards“ und reduzierter Spindelaktivität zu betrachten.

Der hohe Prozentsatz von unreduziert funktionierenden Eizellen bei Bestäubung von diploiden Hybridpflanzen mit Pollen polyploider Vaterpflanzen (vgl. S. 381 sowie EHRENDORFER 1959 e, f; Parallelbeispiele bei TISCHLER 1953—1957, 541 ff.) ist wohl nicht auf eine derartige, durch Störungen der Chromosomenreproduktion bedingte Restitutionskernbildung zurückzuführen, da in den Nachkommenschaften keine Folgen von Bruchvorgängen festgestellt werden können.

Die seltenen, aus der F_1 von *A. asplenijolia* \times *A. setacea* spontan entstandenen Allopolyploiden (S. 381) sind wegen des praktisch vollständigen Fehlens funktionsfähiger diploider Pollenkörper mit größter Wahrscheinlichkeit durch zygotische Chromosomenverdoppelung entstanden.

Einzelheiten über Auftreten von Wildsippen und Hybriden mit unreduzierten Eizellen, über entsprechende Steuerfunktionen akzessorischer Chromosomen und über die Entstehung der Polyploiden bei *Achillea* sollen in folgenden Arbeiten (EHRENDORFER 1959 e, f) dargestellt werden.

3. Intra-individuelle Aneuploidie

Als intra-individuelle Aneuploidie¹ wurde im speziellen Teil die Inkonsistenz der Zahl der Normalchromosomen innerhalb des Einzelpflanzensubjekts bezeichnet, wobei alle mit Vervielfachung ganzer Chromosomensätze zusammenhängenden Phänomene (Polysomatik) auszuschließen sind. Intra-individuelle Aneuploidie kann offensichtlich sehr verschiedenartige Ursachen haben. Wenn die z. T. noch unklaren, aber anscheinend recht häufigen zoologischen Beispiele (unter anderem mit zentrischem Zerfall bzw. Fusion der Chromosomen) und die Sondergruppe der akzessorischen Chromosomen unberücksichtigt bleiben, so dürften sich die bisher bekannten, ± eindeutigen und spontanen Fälle bei höheren Pflanzen 2 Hauptgruppen zuordnen lassen: 1. Erscheinungsbild: Oszillation, vielfach aber extreme Veränderungen der Chromosomenzahl, und zwar überwiegend Reduktion, z. T. mit Hervortreten der Grundzahlen, so daß der Eindruck einer Genomsonderung entsteht; keine Koppelung mit Chromosomenaberrationen; in vegetativen und generativen Geweben; auslösendes Agens ist überwiegend ein defekter Spindelmechanismus, besonders gespaltene und mehrpolige Spindeln; fast ausschließlich bei Polyploiden, besonders bei jungen, experimentell hergestellten Typen. 2. Erscheinungsbild: nur mäßige Oszillation der Chromosomenzahl, eher mit Tendenz zur Vermehrung der Chromosomen; meist mit Chromosomenaberrationen gekoppelt; besonders in generativen Geweben (z. B. in prämeiotischen Mitosen); auslösendes Agens ist überwiegend Non-Disjunction einzelner Chromosomen; bei Diploiden aber auch Polyploiden, oft bei Hybriden. — Als Beispiel für spontane intra-individuelle Aneuploidie, vor allem aus der neueren Literatur mögen angeführt werden für Gruppe 1: VAARAMA (1949), SACHS (1952a), QUADT (1955), SNOAD (1955a), BRITTON und HULL (1957), MÜNTZING (1957), GOTTSCHALK (1958); für Gruppe 2: LESLEY und FROST (1927), BEADLE (1932d, 1937), BERGMANN (1935), MÜNTZING und PRAKKEN (1941), MÜNTZING und AKDIK (1948), ONO und SAKAI (1952), SKALINKA (1954), KATO (1955), RUTISHAUSER (1956b). Zwischen Gruppe 1 und 2 vermitteln einige Polyploide, wozu man etwa die folgenden Arbeiten vergleiche: JONES und BAMFORD (1942), HEGWOOD und HOUGH (1958) sowie POHLENT (1958). — Die intra-individuelle Aneuploidie bei diploiden (und triploiden) Achilleen gehört als typisches Beispiel zu Gruppe 2. Die verallgemeinernden Hypothesen von SHARMA und SHARMA (1957) über intra-individuelle Aneuploidie erweisen sich zumindest hier als unzutreffend.

Für die Frage nach den Ursachen der intra-individuellen Aneuploidie in PMZ von *Achillea* ist wesentlich, daß hier Spindeldefekte und Ent-

¹ In der Literatur findet sich vielfach der wenig passende Begriff „somatische“ Aneuploidie.

stehung überzähliger telozentrischer Chromosomen ausgeschlossen werden können; die naheliegendste Ursache ist demnach Non-Disjunction von Einzelchromosomen in prämeiotischen Mitosen. Entsprechende Vorgänge in der Meiose konnten auch unmittelbar beobachtet werden (S. 378). Die Blockadepunkte liegen in den Chromosomenschenkeln bzw. terminal, das Centromer zeigt Normalverhalten.

Das Störungssyndrom Chromosomenaberrationen — Non-Disjunction — intra-individuelle Aneuploidie (II) läßt sich auch experimentell auslösen (vgl. dazu etwa KAUFMANN und DAS 1955, JAIN 1957). Entsprechende Effekte bei Kältebehandlung zeigen, daß dabei vielfach als heterochromatisch gedeutete Differentialsegmente beteiligt sind (DARLINGTON und LA COUR 1940, GEITLER 1940c, SHAW 1958). Eine gleichartige Rolle des Heterochromatins wird für die spontane Non-Disjunction bei *Drosophila* (HINTON 1957) und *Trillium* (RUTISHAUSER 1956b) angegeben. In derselben Linie liegen die vielen Befunde an heterochromatischen akzessorischen Chromosomen, bei denen Non-Disjunction und intra-individuelle Aneuploidie — vielfach auf bestimmte Gewebe und Zelltypen beschränkt — besonders häufig sind. Da auch die stark heterochromatischen akzessorischen Chromosomen bei *Achillea* vielfach gerade in den prämeiotischen Mitosen besonders starke Non-Disjunction und intra-individuelle Aneuploidie zeigen (EHRENDORFER 1959e), darf hinsichtlich der Normalchromosomen auf ähnliche Ursachen geschlossen werden. Ob die Non-Disjunction allerdings durch lokalisierte Stickiness oder eher durch subchromatidale Brüche bzw. mangelhafte Chromatidenreplikation bedingt ist (vgl. S. 388) und inwieweit dabei auch eine Steuerfunktion des Centromers mitbeteiligt ist, das bleiben vorläufig noch ungelöste Fragen. — Hinsichtlich der Tendenz zur Vermehrung der Chromosomenzahl in den PMZ somatisch instabiler Pflanzen muß auf Zellkonkurrenz zugunsten von Pluszellen und (oder) auf inäquale Verteilung von nachhinkenden Elementen in den Differenzierungsteilungen zwischen Tapetum und PMZ geschlossen werden.

4. Störungen der meiotischen Chromosomenpaarung

Bei den diploiden Achilleen ist ein Zusammenhang zwischen Störungen der Chromosomenreproduktion und mangelhafter Bivalentbildung nur angedeutet und einseitig, in der Weise, daß nur bei einem Teil der chromosomenreproduktiv gestörten Pflanzen eine merkliche Reduktion der Chromosomenpaarung und vermehrte Univalentbildung feststellbar ist (S. 379). Das steht im Gegensatz zu einigen anderen spontanen Fällen, bei denen über Defekte der Synchronisierung der Meioseprozesse viel engere Relationen zwischen Aberrationen und mangelhafter Paarung (Asynapsis bzw. Desynapsis) vorliegen.

Die Störungen der meiotischen Chromosomenpaarung äußern sich bei *Achillea* in einer reduzierten Chiasma-Frequenz und damit korrelier-tem Auftreten von bis zu 10% PMZ mit 2 (sehr selten 4) desynaptischen¹ Univalentchromosomen bei etwa 30—40% der Individuen aller geprüf-ten Wildsippen; das entspricht in der Größenordnung etwa den Ver-hältnissen bei *Paeonia japonica* (HAGA und OGATA 1956). Bei expe-mentellen Hybriden ist die Univalentrat — zumindest bei unseren Wiener Linien — nur mäßig erhöht. Als Folge treten Individuen mit 1 bzw. 2 zusätzlichen Chromosomen auf (S. 381), wie sie allerdings in Wildpopulationen bisher noch nicht aufgefunden werden konnten.

Aus dem Nebeneinandervorkommen von normalen Individuen und solchen mit ± stark ausgeprägter Desynapsis muß — ähnlich wie für die Chromosomenaberrationen (S. 392 ff.) — auf idiotypische Steuer-faktoren und ihre weite Verbreitung als *Normalbestandteile* des Gen-reservoirs bei den Populationen diploider Achilleen geschlossen werden.

Diese Tatsache ist vor allem für ein Verständnis der Chromosomenpaarung bei den polyploiden *Achillea*-Sippen mit fehlender oder stark reduzierter Multi-valentbildung von Bedeutung (EHRENDORFER 1959c, d) und wird in einer folgenden Arbeit (1959f) ausführlich diskutiert werden.

5. Versuch einer ursächlichen Deutung des Störungsbildes

Das gesamte Störungsbild der Pollenmeiose bei diploiden Achilleen wird durch zwei, nur geringfügig miteinander in Beziehung stehende Störungssyndrome bestimmt: I. Gesenkte Chiasma-Frequenz — Uni-valentbildung — aneuploide Nachkommenschaft, II. Störungen der Chromosomenreproduktion: abnormer Formwechsel und Aberrationen — zugeordnete Spindelstörungen und Restitutionskernbildung — Non-Disjunction und intra-individuelle Aneuploidie. Diese beiden Störungs-syndrome sind offensichtlich idiotypisch gesteuert und von grundlegen-der Bedeutung für den phylogenetischen Entwicklungsprozeß der diploiden und polyploiden *Achillea*-Populationen (vgl. EHRENDORFER 1959d, f).

Wie die Befunde bei *Achillea* und die Literaturangaben über spontane und induzierte Störungen der Chromosomenreproduktion zeigen, muß das Störungssyndrom II auf Defekte im Eu- und Heterochromatinsystem und weiter wahrscheinlich auf Defekte im DNS-Metabolismus zurück-geführt werden (vgl. dazu die Literaturangaben über spezifische DNS-Gifte bei BRACHET 1957). Im Störungsgeschehen spielen dabei offen-sichtlich heterochromatische Chromosomenabschnitte eine wichtige Rolle, was oben schon für Spiralisierung (S. 387), Non-Disjunction (S. 398)

¹ In der Prophase konnten bisher nur gepaarte Chromosomen festgestellt werden; die Univalente zeigen in der Metaphase vielfach noch ganz deutliche Lagebeziehungen zueinander (vgl. SCHNEIDER 1958).

und auch für die Bruchsteuerung (S. 394) angedeutet wurde. Als Ergänzung sei hier nur hingewiesen auf die höhere Bruch- (bzw. geringere Restitutions-)Rate im Heterochromatin nach experimenteller Bruchauslösung (KNAPP und HOFFMANN 1939, HEITZ 1940, HANNAH 1951, MCLEISH 1954, GLÄSS 1956, KEYL 1958), die spontanen Fälle von Bruchsteuerung im Heterochromatin beim Mais (MCCLINTOCK 1951, 1953, 1956), *Drosophila* (HINTON 1957) und *Trillium* (RUTISHAUSER

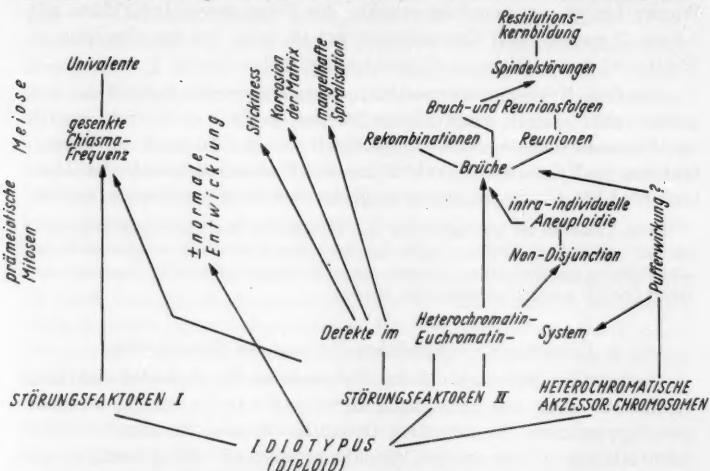


Abb. 8. Versuch einer schematischen Darstellung der Zusammenhänge zwischen den Einzelkomponenten im Störungsbild der Pollenmeiose bei diploiden Achilleen: Störungssyndrom I: Mangelhafte Syndese und Störungssyndrom II: Defekte Chromosomenreproduktion (weitere Erklärungen im Text)

und LA COUR 1956), die vielfach belegte größere strukturelle Variabilität in heterochromatischen Chromosomenabschnitten (GOTTSCHALK 1954, HAGA und KURABAYASHI 1954, BOSE 1957 usw.) und in heterochromatischen akzessorischen Chromosomen (vgl. EHRENDORFER 1959e)¹; weitere Zusammenhänge dürften sich ergeben aus der Bedeutung des Heterochromatins im DNS-Metabolismus (SCHULTZ 1956, BRACHET 1957) und aus seinem, vom Euchromatin wohl auch chemisch verschiedenen Aufbau (CASPERSSON 1940c). Alle diese Daten lassen es als wahrscheinlich erscheinen, daß normaler DNS-Metabolismus und das Balancesystem Eu-/Heterochromatin eng miteinander verknüpft sind, daß sich entsprechende Defekte vielfach im bzw. über das Heterochromatin aus-

¹ Wobei natürlich auch eine geringere selektive Elimination von Strukturänderungen in den akzessorischen Chromosomen in Rechnung gestellt werden muß!

wirken und daß derartige Defekte vor allem in den kritischen Differenzierungsphasen vor und während der Meiose auftreten. Unter diesem Gesichtspunkt wird auch Verhalten und Funktion der heterochromatischen akzessorischen Chromosomen bei *Achillea* verständlich, wobei auf wahrscheinliche Bruchpufferung (S. 395), somatische Labilität mit ihren Auswirkungen und andere Phänomene hingewiesen sei (EHRENDORFER 1959 e). Es dürfte lohnen, in Zukunft die Beziehungen zwischen Chromosomenaberrationen und heterochromatischen akzessorischen Chromosomen genauer zu untersuchen, wobei etwa *Secale* oder *Zea* (*Ac-Ds*-System!) günstige Objekte abgeben würden.

Entsprechend den im allgemeinen Teil entwickelten Vorstellungen wurde versucht, in Abb. 8 einige der Zusammenhänge zwischen den Einzelkomponenten der Störungssyndrome bei diploiden Achilleen graphisch darzustellen.

Zusammenfassung

1. Ausmaß, Verbreitung und Wesen der spontanen Störungen der Pollenmeiose bei diploiden Sippen von *Achillea* wurden an Hand cytologischer Analysen von 43 Wildformen (davon 1 Triploide) und 22 F_1 - und F_2 -Pflanzen untersucht. Die Daten beziehen sich auf *A. setacea*, *A. asplenifolia* und spontane Introgressionspopulationen (*A. roseo-alba*) sowie experimentelle Hybriden zwischen diesen beiden Basissippen des *A. millefolium*-Komplexes, weiters auf die verwandtschaftlich etwas ferner stehenden *A. nobilis* und *A. odorata*, *A. crithmifolia*, *A. tomentosa*, *A. coarctata* sowie *A. grandifolia*.

2. Auf Grund der Korrelation bzw. Unabhängigkeit der Einzelkomponenten des Störungsbildes muß auf das Vorliegen von 2 Störungssyndromen geschlossen werden: I. Störungen der Syndese, II. Störungen der Chromosomenreproduktion¹.

3. Störungssyndrom I umfaßt Reduktion der Chiasma-Frequenz, Bildung von 2 (4) desynaptischen Univalenten in bis zu 10% der PMZ und Auftreten von Aneuploidien in den Nachkommenschaften (von 208 F_2 : 2,9% 18+1, 0,5% 18+2). Nennenswerte Univalentbildung erfolgt in etwa 30—40% der Individuen aller untersuchten diploiden Wildsippen. Die Reduktion der Chiasma-Frequenz ist offensichtlich idiotypisch gesteuert und nur mäßig von Störungen der Chromosomenreproduktion (II) beeinflußt.

4. Störungssyndrom II umfaßt abnormen Formwechsel und Aberrationen der Chromosomen sowie zugeordnete Folgeerscheinungen:

a) Mitotische Non-Disjunction einzelner Chromosomen in prämeiotischen Mitosen und mäßige intra-individuelle Aneuploidie der PMZ mit Tendenz zur Vermehrung der Chromosomen.

¹ Vgl. Fußnote S. 366.

- b) Meiotische Non-Disjunction einzelner Chromosomenbivalente in der Anaphase I mit punktförmigen interstitiellen Blockaden oder terminalen, brückenartigen Verklebungen.
- c) Stickiness und Korrosion der Matrix sowie mangelhafte Spiralsation.
- d) Spontane Brüche im wesentlichen nach der letzten prämeiotischen Mitose und vor dem Zygotan, Reunionen auch noch später. Keine Fehlteilungen bzw. Brüche im Centromer.
- e) Bruchfolgen: achromatische Stellen, angeheftete und freie Chromosomen-, vereinzelt auch Chromatidfragmente; Isolation im wesentlichen zwischen Diakinese und Metaphase I. Fragmentmassen teilweise gegenüber dem Hauptanteil des Zellkerns desynchronisiert. Heteromorphe Bivalente.
- f) Reunionsfolgen: Multivalentbildung zwischen Nicht-Homologen als Folge von Translokationen, Anaphase I- und II-Brücken als Folgen von fehlerhaftem Chromatidaustausch zwischen Schwesternchromatiden oder zwischen gepaarten Homologen, Inversionen mit Crossing-over und Translokationen.
- g) Spindeldefekte und Restitutionskernbildung in sehr stark gestörten PMZ.
- h) Mäßige neozentrische Aktivität von Fragmenten und Univalenten.
5. Das Störungsbild (II) zeigt innerhalb ein und derselben Pflanze starke Labilität, vielfach liegen ungestörte sowie mäßig und stark gestörte PMZ im gleichen Pollenfach nebeneinander. Die Störungsintensität nimmt \pm stufenweise zu. Selbst stark gestörte Pflanzen haben aber kaum mehr als 30% defekte PMZ und sind zumindest partiell steril.
6. Ein Vergleich zwischen spontanen und induzierten Störungen der Chromosomenreproduktion läßt vermuten, daß bei *Achillea* dem Störungssyndrom II Defekte im Eu- und Heterochromatin und weiters im DNS-Metabolismus zugrunde liegen.
7. 27,9% der untersuchten diploiden Wildformen zeigen \pm starke Defekte der Chromosomenreproduktion, wobei die Möglichkeit einer modifikativen Auslösung wegfällt. Gestörte und ungestörte Individuen treten als Schwesternpflanzen nebeneinander in F_1 - und F_2 -Serien auf. Die Störungen sind demnach überwiegend genetisch (bzw. kryptostruktuell) bedingt, die Störungsfaktoren sind als „Mutatorgene“ Normalbestandteile des Genreservoirs der Populationen diploider Achilleen. Durch Hybridisierung wird die Wirkung der Störungsfaktoren verstärkt.
8. Stark heterochromatische akzessorische Chromosomen (in intra-individuell \pm stabiler Zahl) üben offensichtlich eine Pufferwirkung gegen die Auslösung von Defekten der Chromosomenreproduktion (besonders Aberrationen) aus.

Literatur

(Um das Literaturverzeichnis möglichst raumsparend zu gestalten, wurde auf Wunsch der Redaktion auf die Aufnahme derjenigen im Text genannten Arbeiten verzichtet, die schon bei TISCHLER 1942—1951 und 1953—1957 angeführt sind; im folgenden fehlende Zitate mögen in den genannten Bänden dieses Handbuches nachgesehen werden.)

- BOEHRINGER, F.: Über die Kernverhältnisse und die Entwicklung der merogonischen Amphibienbastarde *Triton* (♀) × *Salamandra* (♂). Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. 188, 376—422 (1938).
- BOSE, S.: Aberrations in the nucleolar ch:romosome of inbred rye. II. Size variations in inbred lines and population plants. Hereditas (Lund) 43, 621—643 (1957).
- BRACHET, J.: Biochemical cytology. New York: Academic Press 1957.
- BRITTON, D. M., and J. W. HULL: Mitotic instability in *Rubus*. J. Hered. 48, 11—20 (1957).
- CLAUSEN, J., D. D. KECK and W. M. HIESEY: Experimental studies on the nature of species. III. Environmental responses of climatic races of *Achillea*. Publ. Carnegie Inst. Wash. No 581, 129 S. (1948).
- D'AMATO, F., and O. HOFFMANN-OSTENHOF: Metabolism and spontaneous mutations in plants. Advanc. Genet. 8, 1—28 (1956).
- DARLINGTON, C. D., and A. HAQUE: The timing of mitosis and meiosis in *Allium ascalonicum*: a problem of differentiation. Heredity 9, 117—127 (1955).
- DARLINGTON, C. D., and M. KEFALLINOU: Correlated chromosome aberrations at meiosis in *Gasteria*. Chromosoma (Berl.) 8, 364—370 (1957).
- DAVIDSON, D. C.: The irradiation of dividing cells. I. The effects of X-rays on prophase chromosomes. Chromosoma (Berl.) 9, 39—60 (1957).
- EBERLE, P. C.: Zytologische Untersuchungen an *Gesneriaceae*. II. Die Verkürzung eu- und heterochromatischer Chromosomenabschnitte vom Pachytän bis zur Metaphase. Ber. dtsch. bot. Ges. 70, 323—332 (1957).
- EHRENBURG, L., Å. GUSTAFSSON and D. v. WETTSTEIN: Studies on the mutation process in plants — regularities and intentional control. Conference on Chromosomes, Zwolle, 29 S., 1957.
- EHRENDORFER, F.: Akzessorische Chromosomen, Kreuzungsfertilität und Polyploidie beim *Achillea millefolium*-Komplex (*Compositae*). Naturwiss. 44, 405 bis 406 (1957). — *Achillea roseo-alba* EHRENDF., spec. nov., eine hybridogene, di- und tetraploide Sippe des *Achillea millefolium*-Komplexes. Öst. bot. Z. 1959 a (im Druck). — Spindelfekte, mangelhafte Zellwandbildung und andere Meiosestörungen bei polyploiden Sippen des *Achillea millefolium*-Komplexes. (Zur Phylogenie der Gattung *Achillea*, III.) Chromosoma (Berl.) 1959 c (im Druck). — Unterschiedliche Störungssyndrome der Pollenmeiose bei diploiden und polyploiden Sippen des *Achillea millefolium*-Komplexes und ihre Bedeutung für die Mikro-Evolution. (Zur Phylogenie der Gattung *Achillea*, IV.) Chromosoma (Berl.) 1959 d (im Druck). — Struktur, Verhalten, Funktion und Entstehung akzessorischer Chromosomen bei *Achillea*. (Zur Phylogenie der Gattung *Achillea*, V.) Z. Vererb.-Lehre 1959 e (im Druck). — Mechanismen der Mikro-Evolution bei diploiden und polyploiden Sippen des *Achillea millefolium*-Komplexes. (Zur Phylogenie der Gattung *Achillea*, VI.) Z. Vererb.-Lehre 1959 f (in Vorbereitung).
- GLÄSS, E.: Die Verteilung von Fragmentationen und achromatischen Stellen auf den Chromosomen von *Vicia faba* nach Behandlung mit Schwermetallsalzen Chromosoma (Berl.) 8, 260—284 (1956).

- GOTTSCHALK, W.: Über Abregulierungsvorgänge bei künstlich hergestellten hochpolyploiden Pflanzen. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 204—215 (1958).
- GUSTAFSSON, Å.: Studies on the experimental control of the mutation process. *Radiobiol. Symp.* 1954, p. 282—284. 1954.
- HAGA, T., and M. KURABAYASHI: Genom and polyploidy in the genus *Trillium*. V. Chromosome variation in natural populations of *T. kamtschaticum* PALL. *Mem. Fac. Sci. Kyushu Univ.*, Ser. E **1**, 159—185 (1954).
- HAGA, T., and T. OGATA: A cytological survey of a natural population of *Paeonia japonica*, with special reference to the failure of meiotic chromosome pairing. *Cytologia (Tokyo)* **21**, 11—20 (1956).
- HANNAH, A.: Localization and function of heterochromatin in *Drosophila melanogaster*. *Advanc. Genet.* **4**, 87—127 (1951).
- HEGWOOD, M. P., and L. F. HOUGH: A mosaic pattern of chromosome numbers in the white winter pearmain apple and six of its seedlings. *Amer. J. Bot.* **45**, 349—354 (1958).
- HEITZ, E.: Durch Röntgenstrahlen ausgelöste Mutationen bei *Pellia neesiana*. *Verh. schweiz. naturforsch. Ges.* **140**, 170—171 (1940).
- HINTON, C. W.: The analysis of rod derivatives of an unstable ring chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **42**, 55—65 (1957).
- HOLDEN, J. W. H., and M. MOTA: Non-synchronised meiosis in binucleate pollen mother cells of an *Avena* hybrid. *Heredity* **10**, 109—117 (1956).
- JAIN, H. K.: Effect of high temperature on meiosis in *Lolium*: nucleolar inactivation. *Heredity* **11**, 23—36 (1957).
- KEYL, H.-G.: Untersuchungen am Karyotypus von *Chironomus thummi*. II. Strukturveränderungen an den Speicheldrüsenschromosomen nach Röntgenbestrahlung von Embryonen und Larven. *Chromosoma (Berl.)* **9**, 441—483 (1958).
- KLINGSTEDT, H.: Taxonomic and cytological studies on grasshopper hybrids. I. Morphology and spermatogenesis of *Chorthippus bicolor* CHARP. × *Ch. biguttulus* L. *J. Genet.* **37**, 389—420 (1939).
- KOLLER, P. C.: Chromosome breakage. *Progr. Biophysics* **4**, 195—243 (1954).
- LESLEY, J. W., and M. M. LESLEY: Chromosome fragmentation and mutation in tomato. *Genetics* **14**, 321—336 (1929).
- MAZIA, D.: The particulate organization of the chromosome. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **40**, 521—527 (1954).
- MCLINTOCK, B.: Induction of instability in selected loci of maize. *Genetics* **38**, 579—599 (1953). — Intranuclear systems controlling gene action and mutation. *Brookhaven Symp. Biol.* **8**, 58—74 (1956).
- MOUTSCHEN-DAHMEN, J., et M. MOUTSCHEN-DAHMEN: Sur l'évolution des lésions causées par la 8-Ethoxycéphaline chez *Hordeum sativum* et chez *Vicia faba*. *Hereditas (Lund)* **44**, 18—36 (1958).
- MÜNTZING, A.: Cytogenetic studies in ryewheat (*Triticale*). *Proc. Intern. Genet. Sympos.* 1956, Tokio and Kyoto, p. 51—56. 1957.
- MULLER, H. J.: On the relation between chromosome changes and gene mutations. *Brookhaven Symp. Biol.* **8**, 126—147 (1956).
- NIELSEN, E. L.: Cytological disturbances influencing fertility in *Bromus inermis*. *Bot. Gaz.* **116**, 295—305 (1956).
- NYBOM, N.: Mutation types in barley. *Acta agric. scand.* **4**, 430—456 (1954).

- ONO, H.: Intergeneric hybrid swarms of *Cichorieae*. Abstr. Intern. Genetics Sympos., Japan 1956, p. 26—27. 1956.
- POHLENT, G.: Variabilität der Chromosomenzahlen und andere Kernpathologien in *Aegilops triuncialis* × *Triticum aestivum*-Bastarden. Z. Vererb.-Lehre **89**, 170—188 (1958).
- REES, H.: Genotypic control of chromosome behaviour in rye. I. Inbred lines. Heredity **9**, 93—116 (1955). — IV. The origin of new variation. Heredity **11**, 185—193 (1957).
- REES, H., and J. B. THOMPSON: Localisation of chromosome breakage at meiosis. Heredity **9**, 399—407 (1955).
- RIEGER, R.: Das Meioseverhalten von Gonokonten mit abnormen Chromosomenzahlen bei *Antirrhinum majus* L. I. Mehrkernige Pollenmutterzellen bei haploiden Formen. Biol. Zbl. **77**, 237—244 (1958).
- RUTISHAUSER, A.: Das Verhalten der Chromosomen in arteigener und artfremder Umgebung. Vjschr. naturforsch. Ges. Zürich **100**, 17—26 (1955a). — Chromosome distribution and spontaneous chromosome breakage in *Trillium grandiflorum*. Heredity **10**, 367—407 (1956b). — Cytogenetik des Endosperms. Ber. schweiz. bot. Ges. **66**, 318—336 (1956c).
- RUTISHAUSER, A., and L. F. LA COUR: Spontaneous chromosome breakage in hybrid endosperms. Chromosoma (Berl.) **8**, 317—340 (1956).
- SAUERLAND, H.: Quantitative Untersuchungen von Röntgeneffekten nach Bestrahlung verschiedener Meiosestadien bei *Lilium candidum* L. Chromosoma (Berl.) **7**, 627—654 (1956).
- SAX, K.: The effect of ionizing radiation on chromosomes. Quart. Rev. Bot. **32**, 15—26 (1957).
- SCHNEIDER, I.: Zytogenetische Untersuchungen an Sippen des Polyploid-Komplexes *Achillea millefolium* L. s. lat. (Zur Phylogenie der Gattung *Achillea*, I.). Öst. bot. Z. **105**, 111—158 (1958).
- SCHULTZ, J.: The relation of heterochromatic chromosome regions to the nucleic acids of the cell. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **21**, 307—328 (1956).
- SHARMA, A. K., and A. S. SHARMA: A theory regarding the stability of chromosome complement in a species. Naturwiss. **44**, 17 (1957).
- SHAW, G. W.: Adhesion loci in the differentiated heterochromatin of *Trillium* species. Chromosoma (Berl.) **9**, 292—304 (1958).
- SKALINSKA, M.: Studies of meiosis in the intergeneric hybrids *Heuchera* × *Tiarella*. Acta Soc. Bot. Polon. **23**, 677—698 (1954).
- SPARROW, A. H.: Radiation sensitivity of cells during mitotic and meiotic cycles with emphasis on possible cytochemical changes. Ann. N. Y. Acad. Sci. **51**, 1508 bis 1540 (1951).
- SPARROW, A. H., J. P. BINNINGTON and V. POND: Bibliography on the effects of ionizing radiations on plants, 1896—1955. Brookhaven Nat. Lab., Upton, N. Y., 222 S. 1958.
- STEBBINS, G. L., and R. SINGH: Artificial and natural hybrids in the *Gramineae*, tribe *Hordeae*. IV. Two triploid hybrids of *Agropyron* and *Elymus*. Amer. J. Bot. **37**, 388—393 (1950).
- SWANSON, C. P.: Cytology and cytogenetics. Engelwood Cliffs, N. Y.: Prentice-Hall 1957.
- THODAY, J. M.: Radiation-induced chromosome breakage, deoxyribose-nucleic acid synthesis and the mitotic cycle in root meristem cells of *Vicia faba*. New Phytologist **53**, 511—516 (1954).

- TISCHLER, G.: Allgemeine Pflanzenkaryologie. 2. Hälfte: Kernteilung und Kernverschmelzung, 2. Aufl. Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. II. Berlin: Gebrüder Bornträger 1942—1951. — Erg.-Bd.: Angewandte Pflanzenkaryologie, Liefg. 1—5. Berlin: Gebrüder Bornträger 1953—1957.
- VAARAMA, A.: Spindle abnormalities and variation in chromosome number in *Ribes nigrum*. *Hereditas* (Lund) **35**, 136—162 (1949).
- WALTERS, J. L.: Heteromorphic chromosome pairs in *Paeonia californica*. *Amer. J. Bot.* **39**, 145—151 (1952). — Spontaneous meiotic breakage in natural populations of *Paeonia californica*. *Amer. J. Bot.* **43**, 342—354 (1956).
- WALTERS, M. S.: Spontaneous breakage of meiotic chromosomes in the hybrid *Bromus trinii* × *B. maritimus*. *Genetics* **35**, 11—37 (1950). — Studies of spontaneous chromosome breakage in interspecific hybrids of *Bromus*. *Univ. Calif. Publ. Bot.* **28**, 335—447 (1957).
- WHITE, M. J. D.: Animal cytology and evolution, 2. edit. Cambridge: Cambridge University Press 1954.

Univ.-Doz. Dr. F. EHRENDORFER,
Botanisches Institut der Universität,
Wien III, Rennweg 14

From the Department of Botany, University of Wisconsin, Madison
THE DNA-CONTENT OF NUCLEI IN THE MERISTEM
OF ONION ROOTS*

By

KLAUS PATAU and D. SRINIVASACHAR

With 7 Figures in the Text

(Eingegangen am 8. Oktober 1958/20. März 1959)

A. Introduction

The microphotometric two wave length method independently proposed by ORNSTEIN (1952) and PATAU (1952a) was first put into use by PATAU and SWIFT (1953). PATAU (1952a) has shown that theoretically this method should be capable of determining the relative dye-contents of stained cytological objects with a very high accuracy, no matter how irregular their shape and texture might be. Distributional and stray light errors should never exceed a few percent. PATAU and SWIFT's measurements on late interphase and mitotic nuclei of all stages demonstrated the capabilities of the new method but left some doubts about the accuracy of the obtained metaphase and anaphase values. These stages required field sizes which were probably excessive in view of certain instrumental imperfections.

PATAU and SWIFT (1953) conclude that the following working hypothesis is still perfectly tenable: "Any genome has a constant amount, C, of DNA. This amount is precisely doubled in the course of any complete genome reproduction (that is one which leads to a doubling of all chromosome strands). Consequently, short of chromosome breaks, asynchronous strand reproduction and mitotic irregularities, all nuclei of an organism which are not in a period of DNA-doubling have DNA-contents that are integer multiples of C." The measurements of these authors showed that the only lasting change in nuclear DNA-content caused by a mitosis is the obvious halving brought about by the anaphase separation. An indicated moderate increase during metaphase and early to middle anaphase appeared inconclusive. One purpose of the present investigation was to check this point. It was soon found that apparent

* Contribution from the programme in Cytology, Department of Botany, University of Wisconsin, Madison, supported by grants to the late Dr. C. LEONARD HUSKINS, from the American Cancer Society upon recommendation of the Committee on Growth of the National Research Council, from the Rockefeller Foundation and from the Research Committee of the Graduate School with funds supplied by the Wisconsin Alumni Research Foundation.

deviations, if generally rather small, from the working hypothesis occurred they went beyond the limits of optical errors. Thus the question of "proportionality errors" caused by deviations from proportionality between Feulgen dye and DNA became important. Clear proof of the occurrence of proportionality errors has been given by SRINIVASACHAR and PATAU (1959).

Previous investigators, both by microphotometry of Feulgen-stained nuclei (reviewed by PATAU and SWIFT, 1953) and by radioautographs (PELC and HOWARD, 1952) have shown that DNA synthesis (doubling) in the meristem of roots takes place well within the interphase. Thus an interphase I with the DNA-content 2C is followed by an interphase II with intermediate DNA-contents and this by an interphase III with the content 4C. It appeared desirable to verify these relations by means of the higher accuracy of the two wave length method.

B. Material and methods

As material for studies roots of onion had been chosen because of their widespread use in the past, and doubtless, future, investigations to which a clear understanding of the changes in DNA-content during the mitotic cycle might be essential.

Roots from seven onion bulbs, all from one commercial sample, were fixed in acetic alcohol 1:3 over-night, kept for 12 hours in 70% alcohol, dehydrated and embedded in paraffin. Roots from two of these bulbs were also fixed in Craf's solution for a short period of one hour, washed in tap water for a long time, 48 hours, to avoid chromic acid staining, kept for 12 hours in 70% alcohol and taken up to paraffin. Under these conditions of fixation and washing both chromic acid staining and plasmal reaction seemed to be completely absent. The acetic alcohol fixative, of course, excludes these complications entirely.

Each paraffin block contained equally fixed roots, and all of these from the same bulb. Sections were always cut longitudinally. In order to keep non-specific absorption as low as possible the microtome sections were cut only $15\ \mu$ thick which in onion is just enough to accommodate the largest diploid prophases with a thin plasma layer above and below. Of the nuclei to be measured the presence of both the plasma layers was always carefully ascertained. The ribbon was divided into a number of pieces that was a multiple of the number n of slides to be prepared. The first piece went on to the first slide, the second on to the second, and so forth. The $n+1$ st was mounted on the first slide, the $n+2$ nd on the second, and so on. Thus, for either fixative, all slides from one bulb contained sections of the same roots. In the slide designations which will be used henceforth, the first number stands for that of the bulb, the letter for the fixation (A: Craf, B: 1:3) and the last number for that of the slide.

The present work was done with microtome sections as it appeared desirable to determine the anatomical location of the measured nuclei in the root. From an optical point of view sections have the advantage of requiring smaller field sizes than squash preparations but they aggravate an optical problem, the non-specific absorption, which will usually be of little concern when squash preparations are measured.

An attempt was made to obtain $15\ \mu$ thick longitudinal sections from living roots (from another bulb of the same sample) by means of PERSIDSKY'S (1953) vibratory microtome. Such sections apparently retain nuclei only in intact cells

and permit a very rapid penetration, and, therefore, highly uniform action of the fixative. These advantages, however, were found to be outweighed by the difficulty of obtaining thin longitudinal sections of this soft material. Only one such slide, 8A 1, was used.

The temperature during hydrolysis with normal hydrochloric acid was carefully maintained between 60 and 61° C. In order to keep the conditions of hydrolysis as reproducible as possible and, in particular, independent of the number of slides put into the hydrochloric acid, it was deemed best to follow DI STEFANO (1948) by pre-warming the slides in distilled water at 60° C previous to hydrolysis instead of immersing them in cold hydrochloric acid. After 1:3 fixation only two durations of hydrolysis, 6 and 8 minutes, were used. Both are presumably close to the maximum of the Feulgen hydrolysis curve. The same holds true for 10 and 15 minutes after Craf fixation.

Apart from hydrochloric acid, perchloric acid and phosphoric acid were tested as hydrolysing agents on Craf sections using the temperatures and times mentioned in Table 4 (slides 4A 6 and 8A 1). These conditions have been recommended by DI STEFANO (1952) and HASHIM (1953) respectively, who, however, used other fixatives.

The Feulgen solution (Schiff reagent) was prepared, strictly in the manner recommended by STOWELL (1945), from a National Aniline dye (basic fuchsin; C. I. No. 677, certification No. NF 59, dye-content 88%) and was kept in a refrigerator. It is conceivable that not only the wave lengths, λ_1 , λ_2 but also several of the results to be reported in the subsequent sections are dependent on the Fuchsin sample and on how the Feulgen solution is prepared.

The slides were stained for one hour in the Feulgen solution. They were then taken through three changes of ten minutes each of sulphurous acid bleaching solution [freshly prepared according to STOWELL (1945); henceforth called SO₂ water], rinsed for two minutes in distilled water, passed, in steps of ten minutes each, through the alcohol series 50, 70, 83, 95, 100, 100%, and mounted in H.S.R. (Harleco synthetic resin) from xylol.

The DNA-content of nuclei, in arbitrary units, was measured in accordance with the procedure outlined by PATAU (1952a) for the two wave length method with some modifications. The microspectrophotometer used for these measurements was assembled specially for this purpose (c. f. SRINIVASACHAR, 1953).

C. Investigations and results

I. Methods of measurement

The non-systematic reading errors appear to be largely due to fluctuations of the line current. In order to keep the reading errors as small as possible, the following procedure was adopted. It appeared important to take the two readings which establish a transmission, T , in rapid succession. Since a quick change-over is possible only from object to blank, the sequence recommended by PATAU (1952a) was modified accordingly. I_{21} , I_{20} , I_{11} , I_{10} were measured in this succession. After a slight turn of the sensitivity control knob the sequence was repeated. All the four transmissions were computed and the differences, d , between transmissions at the same wave lengths were found out (Table 1). A value γ' , henceforth referred to as a "replication" was computed from the two mean transmissions. Of each nucleus at least two, more often four, replications γ_1 , γ_2 , etc. were determined. The symbol $\bar{\gamma}$ is reserved for the mean of all replications from one nucleus. $\bar{\gamma}$ stands for the mean dye- or DNA-content of a sample of nuclei.

It would be expected that occasionally values of T would occur which had been thrown off by some sort of accident such as a reading mistake or a small

Table 1. Sample computation of the DNA-content (in arbitrary units) of an interphase nucleus. γ_1 represents one "replication"; I_{11} , I_{11} : galvanometer readings with nucleus in field; I_{10} , I_{10} : same with empty field; T_1 , T_1 : transmission of field with area $B = 88.66$ (in arbitrary units). L_1 , L_2 : relative light loss; C taken from PATAU's (1952a) Table I. $T_{01} = 0.9778$, $T_{02} = 0.9789$ (see text)

$\lambda_1 = 4800 \text{ \AA}$ (filter: Wratten 47)						$\lambda_2 = 5004 \text{ \AA}$ (filter: "light blue" + Wratten 38 A)	C		
I_{11}	I_{10}	T_1	d	$L_1 = 1 - T_1$	I_{10}	T_2	$L_2 = 1 - T_2$	$Q = L_2/L_1$	$\gamma_1 = BL_1C$
77.2	89.5	0.8626	-0.0121	70.8	86.9	0.8147			
76.8	87.8	0.8747		69.8	85.8	0.8135	+ 0.0012		
discarded because of $ d > c$									
78.0	90.0	0.8867	+ 0.0008						
76.2	88.0	0.8659							
mean: 0.8663				0.1337	mean: 0.8141				
Correction for non-specific absorption									
$T'_1 = T_1/T_{01} = 0.8860$		0.1140			0.1684	$T'_2 = T_2/T_{02} = 0.8316$	1.477	1.416	14.31

$T'_1 = T_1/T_{01} = 0.8860$ | 0.1140 | 0.1684 | $T'_2 = T_2/T_{02} = 0.8316$

but lasting change in the galvanometer, or in the current, between two readings¹. Such "off-values" are, indeed, indicated by a small minority of differences which fall far outside of what otherwise is an approximately normal distribution of d (Fig. 1). In order to eliminate these off-values a limit c can be chosen so that all pairs of transmissions with absolute values $|d| \geq C$ are replaced by new measurements. Since the sole criterion of rejection is lack of consistency amongst the values going into the same replication, no bias is introduced. Statistical tests based on the variation of replications become somewhat more stringent since this variation is decreased but remain perfectly valid as the replications continue to vary independently of each other. It should be noted that such an "unbiased elimination of off-values" could also be applied to measurements by the conventional photometric methods. The "effectiveness" of a value c is obviously proportional to the percentage of pairs of transmissions which are not discarded and inversely proportional to the mean square deviations $s^2(\gamma_p)$ of replications from the nuclear mean. If $g/s^2(\gamma_p)$ is at its maximum a maximum of information will be obtained from a given amount of work. The choice of c is not critical as g decreases rapidly only for fairly small values c (see Fig. 1) while an appreciable increase of $s^2(\gamma_p)$ takes place only with large c . However, if no measurements had been discarded ($c = \infty$) an over-all loss of effectiveness of about 29% relative to that of $c = 0.006$ would have resulted. In the present study $c = 0.007$ was used throughout as the criterion of rejection. Two hundred and thirteen out of altogether 2107 pairs

¹ Because of the low light input, no fatigue of the phototube was encountered.

of transmissions had to be discarded, that is 10.1%. $(2107 - 213)/2 = 947$ is the total number of replications determined.

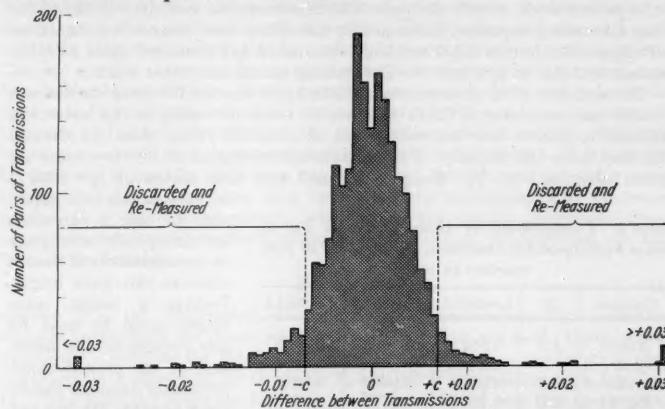


Fig. 1. "Unbiased elimination of off-values". Mean of pair of transmissions is; for each wave length, entered into computation of single replication (see Table 1)

II. Non-specific absorption

The non-specific absorption was measured in two slides which had been hydrolysed but not stained. The term "non-specific absorption" is here used in a loose

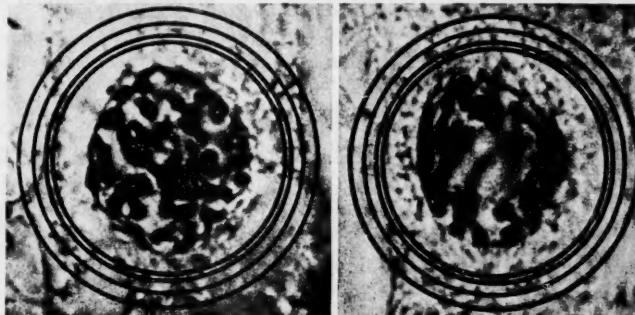


Fig. 2. Nuclei and field sizes used for measuring non-specific absorption (see Table 2). Photographed after staining. Left: Craf; right: 1:3 fix. 2900 \times

sense to cover all those losses, apart from absorption by the Feulgen-dye, which the light reaching the phototube has suffered when passing through the object or other structures in the field. The term, consequently, refers not only to actual absorption but also to deflection of any kind, such as scattering by small particles. In one of the slides the roots had been fixed in acetic alcohol 1:3, and in the other with Craf's solution. In each slide one prophase was selected which was completely intact in the 1:3 slide but had been sectioned in the Craf slide. The transmissions of fields of different diameter with the nucleus in a central position (Fig. 2) was

measured at $\lambda_0 = 4000 \text{ \AA}$, $\lambda_1 = 4800 \text{ \AA}$ and $\lambda_2 = 5004 \text{ \AA}$ (λ_1 , λ_2 being the wave lengths used for all DNA determinations). The blank readings were taken, always in the present work, outside the root. The measurements were done in eight runs in an alternating sequence. Subsequently the slides were demounted, immersed in Feulgen-stain for the usual one hour, remounted and measured again with the smallest field size at $\lambda_0 = 4800 \text{ \AA}$. The staining turned out rather weak.

The outcome of the measurements (Table 2) justifies the following conclusions: (i) after only one hour in Craf's fixative, 48 hours of rinsing in tap water was sufficient to remove any noticeable trace of whatever yellow stain the chromic acid may have left initially. The transmissions obtained in the two cases are almost identical. (ii) The Feulgen dye used here does absorb at $\lambda_0 = 4000 \text{ \AA}$.

In view of this it is impossible to base a correction for non-specific absorption on measurements of stained slides at this wave length. Perhaps a longer wave length could be used for this purpose but the dispersion of the present monochromator becomes insufficient towards the red end. (iii) The non-specific absorption by the unstained nucleus appears to be largely due to light scattering by small particles. Such scattering is, according to RAYLEIGH's law, inversely proportional to the fourth power of the wave length, and this relation is approached with the smallest field size. The observed ratios of extinctions for λ_0 and λ_1 are $E_0/E_1 = 1.85$ for 1:3 and 1.59 for Craf as compared with the expected value $(\lambda_1/\lambda_0)^4 = 2.07$. For λ_1 and λ_2 the observed ratios are 1.09 and 1.16, as compared with the expected value $(\lambda_2/\lambda_1)^4 = 1.18$. (iv) In the larger fields the total non-specific absorption varies less with wave length.

A complete elimination of systematic errors due to non-specific absorption appears to be almost impossible, at least if many nuclei are to be measured. The situation is very involved indeed. In the first place we have some non-specific absorption by the very same structures that carry the Feulgen-dye. If, as it seems, this should be largely due to light scattering it would depend on the particle size and would, hence, hardly be the same for different stages of the mitotic cycle. However, the visibility of chromosomes at all of these stages including interphases in unstained slides does not appear to differ greatly. So it may be assumed that this non-specific absorption is roughly proportional to the absorption by the Feulgen-dye deposited on the chromosomes. Non-specific absorption for which this holds true can, for all practical purposes, be regarded as part of the Feulgen absorption, if as test object, for the determination of λ_1 and λ_2 , a nucleus is chosen which has a similar structure as those to be measured subsequently. If there are differences in non-specific absorption between chromosomes of different stages λ_1 and λ_2 , as determined by means of an interphase nucleus as test object, would not be entirely right for other stages and a wavelength error (PATAU, 1952a) would enter the comparison of stages. Semi-quantitative considerations indicate that in the case of well stained nuclei such errors will be next to negligible.

Table 2. Transmission of fields shown in Fig. 2. Slides hydrolysed but unstained. D : diameter of field aperture in mm

Fixation	D	$\lambda_0 = 4000 \text{ \AA}$	$\lambda_1 = 4800 \text{ \AA}$	$\lambda_2 = 5004 \text{ \AA}$
Acetic alcohol 1:3 (nucleus of Fig. 2)	1.7	0.9547 (0.8495 ¹)	0.9753	0.9773
	1.8	0.9654	0.9806	0.9836
	2.0	0.9620	0.9720	0.9728
	2.2	0.9798	0.9833	0.9820
Craf (nucleus of Fig. 2)	1.7	0.9598 (0.8912 ¹)	0.9745	0.9780
	1.8	0.9630	0.9752	0.9792
	2.0	0.9761	0.9791	0.9601
	2.2	0.9754	0.9826	0.9836

¹ After staining.

power of the wave length, and this relation is approached with the smallest field size. The observed ratios of extinctions for λ_0 and λ_1 are $E_0/E_1 = 1.85$ for 1:3 and 1.59 for Craf as compared with the expected value $(\lambda_1/\lambda_0)^4 = 2.07$. For λ_1 and λ_2 the observed ratios are 1.09 and 1.16, as compared with the expected value $(\lambda_2/\lambda_1)^4 = 1.18$. (iv) In the larger fields the total non-specific absorption varies less with wave length.

A complete elimination of systematic errors due to non-specific absorption appears to be almost impossible, at least if many nuclei are to be measured. The situation is very involved indeed. In the first place we have some non-specific absorption by the very same structures that carry the Feulgen-dye. If, as it seems, this should be largely due to light scattering it would depend on the particle size and would, hence, hardly be the same for different stages of the mitotic cycle. However, the visibility of chromosomes at all of these stages including interphases in unstained slides does not appear to differ greatly. So it may be assumed that this non-specific absorption is roughly proportional to the absorption by the Feulgen-dye deposited on the chromosomes. Non-specific absorption for which this holds true can, for all practical purposes, be regarded as part of the Feulgen absorption, if as test object, for the determination of λ_1 and λ_2 , a nucleus is chosen which has a similar structure as those to be measured subsequently. If there are differences in non-specific absorption between chromosomes of different stages λ_1 and λ_2 , as determined by means of an interphase nucleus as test object, would not be entirely right for other stages and a wavelength error (PATAU, 1952a) would enter the comparison of stages. Semi-quantitative considerations indicate that in the case of well stained nuclei such errors will be next to negligible.

The non-specific absorption by structures other than chromosomes, such as nucleoli, plasma, cell walls, etc. is a different matter. These structures can be largely avoided when λ_1 and λ_2 are determined by measuring the transmission of a small area of a squashed interphase nucleus. Usually they will also contribute relatively little to the absorption in a whole field containing a squashed nucleus. The non-specific absorption by material other than chromosomes, however, may be considerable in sections. If this material were present above and beneath the nucleus to be measured in about the same amount per unit area as in the surrounding parts of the field, its effect on the measured γ could be entirely eliminated by using as a blank field an area where this material is also present. If this cannot be done and if a really blank area has to be used for obtaining (at either wave length) the value I_0 , the latter must be corrected by multiplying it by the transmission T_0 of the layer of material which causes non-specific absorption. Since (at either wave length) the field transmission is $T = I_1/I_0$ the correction can also be made by forming

$$T' = T/T_0 \quad (1)$$

wherein T is the uncorrected, T' the corrected transmission. This correction becomes particularly important when different field sizes are used. Under otherwise equal conditions the field transmission decreases with increasing field size. Consequently a correction by the same T_0 will affect the relative light loss $L = 1 - T$ the more the larger the field size is. It can easily be seen that uncorrected γ values are always too large and that this error in general increases with increasing field size. Such a correlation was indeed, indicated in the present uncorrected measurements of metaphases and anaphases. After applying the following correction no appreciable correlation between γ and field size B remained.

This correction is based on the values of Table 2 which are taken to be representative for the type of cells on which measurements were made. It is further assumed that the non-specific absorption is approximately independent of the field size. This, of course, is what Table 2 shows. Actually the situation is not quite as simple, as part of the non-specific absorption is caused by chromosomes. It has been pointed out above that this part has more or less been taken care of in the determination of λ_1 and λ_2 . However, non-specific absorption by the chromosomes is, even in the centre of the field, not the only one. There is a considerable amount of plasma around the nuclear membrane, there are the nucleoli, and at metaphase and anaphase there is the spindle. In some cases cell walls intruded more into the field to be measured than in the case of Fig. 2 from which the values of Table 2 were obtained. Altogether it seemed best to use average transmissions taken from Table 2 for a correction according to equation (1) (Table 1). These averages, for λ_1 and λ_2 respectively, are $T_{01} = 0.9778$ and $T_{02} = 0.9789$ for 1:3, $T_{01} = 0.9778$ and $T_{02} = 0.9802$ for Craf. Obviously, this over-all correction is far from perfect and may well have introduced relative optical errors that were larger than the very small residual distributional and stray light errors which even the two wave length method cannot avoid. However, the reduction of γ brought about by the correction, though in itself considerable, is always of similar magnitude so that the crudeness of the correction can hardly have introduced errors of more than a few percent. It will actually be shown that the total effect of all systematic errors, proportionality as well as optical errors (the latter including those arising from imperfections of the correction for non-specific absorption) and of a natural DNA variation, if any, amounts to a coefficient of variation of only 5.5% within samples both of prophase and of metaphase nuclei. It will, furthermore, be seen that there is no evidence of imperfectly corrected non-specific absorption having caused appreciable differences in the mean γ values obtained from different mitotic stages.

The relative importance of non-specific absorption decreases, of course, with increasing absorption by the Feulgen-dye present in the nucleus. The opposite holds true for the relative importance of distributional errors. Since the absorption depends on λ_1 and λ_2 , the choice of λ_1 must be a matter of compromise. If there is relatively much non-specific absorption, as is practically always the case in sections, it will be best to select λ_1 close enough to the peak of the Feulgen absorption curve so as to decrease the average $Q = L_2/L_1$ to somewhere between 1.4 and 1.6 with few Q values below 1.3¹. If Q is allowed to drop further distributional errors may increase unduly.

III. Wave length determination

In view of the intense staining of onion nuclei a rather low value, 4800 Å, was selected for λ_1 . A large, lightly stained, and relatively uniform interphase nucleus in a squashed preparation (fixed in acetic alcohol 1:3, hydrolysed for ten minutes) served as test object. The squash preparation, rather than section, was chosen for its low non-specific absorption and for having a less grainy structure of interphase nuclei. The mean extinction at the test area (of 15.8 μ diameter) inside the nucleus was $E(\lambda_1) = 0.1534$. Care was taken to measure, under oil immersion, always the same spot but slight shifts are hardly avoidable.

Table 3. Example of procedure in wave length determination. I_1 , I_0 : galvanometer reading with, and without, object

$\lambda_1 = 4800 \text{ \AA}$ filter: "light blue"			$\lambda_2 = 4980 \text{ \AA}$ filter: "light blue" + Wratten No. 38 A		
I_1	I_0	$\log I_0 - \log I_1$	I_1	I_0	$\log I_0 - \log I_1$
12.7	17.9				
13.0	17.9				
25.7	35.8	0.1440	9.0 9.1	17.7 17.7	
13.0	19.0		18.1	35.4	0.2913
12.8	19.0				
25.8	38.0	0.1682	9.0 9.1	17.2 17.2	
13.0	18.3				
13.0	18.8		18.1	34.4	0.2789
26.0	37.6	0.1602			
$E_1 = 0.1575$			$E_{26} = 0.2851$		
$\bar{E}_{26}/\bar{E}_1 = 1.810$					

extinction suffers from relatively higher reading errors, for each tested wave length λ_2 three extinctions E_1 and two extinctions E_2 were measured in alternation (Table 3). The ratio of the two mean extinctions \bar{E}_2/\bar{E}_1 is plotted against wave length. A number, in the present case, eight, of such points determine a regression curve of that ratio on wave length. This line, of course, is part of the Feulgen absorption curve. The final value λ_2 is chosen as the wave length at which the regression line attains the ordinate 2: $E(\lambda_2) = 2E(\lambda_1)$. The tested wave lengths λ_2 are best chosen as one goes along so as to bracket this point. In the present case (Fig. 3) the Feulgen absorption curve happens to straighten when plotted on semi-logarithmic paper. Consequently it is best to compute the linear regression of $\log [E(\lambda_2)/E(\lambda_1)]$ on λ_2 . This becomes equal to $\log 2$ at $\lambda_2 = 5003 \text{ \AA}$. Actually $\lambda_2 = 5004 \text{ \AA}$ has been used throughout this study, a value which had been obtained graphically. The difference is negligible.

¹ $Q - 1$ is the transmission of the object at λ_1 (PATAU, 1952a).

A second wave length determination was undertaken in order to check whether the above λ_1 and λ_2 are also correct for sections of roots fixed in Craf's solution. As test object a cap was selected which had been cut off from an interphase nucleus. In view of the grainy structure of such nuclei it was deemed best not to choose too thin a cap so as to keep the non-uniformity within bounds. The mean extinction in the test area was $E(\lambda_1) = 0.2477$. The linear regression of $\log [E(\lambda_2)/E(\lambda_1)]$ yielded the value $E(\lambda_2)/E(\lambda_1) = 1.9012$ for $\lambda_2 = 5004 \text{ \AA}$ and $\lambda_1 = 4800 \text{ \AA}$. This, however, requires a correction for non-specific absorption by the almost 15μ thick layers of extra-nuclear material through which the light had to pass. The uncorrected mean extinction at λ_2 is $E(\lambda_2) = 1.9012 \times E(\lambda_1) = 0.4709$. The mean transmissions obtained from an unstained Craf slide corresponded to the extinctions $E_0(\lambda_1) = 0.0097$ and $E_0(\lambda_2) = 0.0087$. These values are subtracted from $E(\lambda_1)$ and $E(\lambda_2)$ respectively. The corrected ratio of extinction is $0.4622/0.2380 = 1.942 = 2(1 - 0.029)$. In the present measurements of nuclei in Craf sections $Q = L_2/L_1$ ranges from 1.25 to 1.77. PATAU's (1952a) equation (II) for the wave length error can now be applied to the deviation $\Delta = -2.9\%$ from the correct extinction ratio 2:1. It turns out that the largest relative wave length error of γ which the deviation Δ could cause to arise between any two nuclei was smaller than 1.4%. Probably this maximum error was smaller still, since both the higher optical density of the Craf test object and its lesser uniformity (compared with the 1:3 test object) must have depressed the extinction ratio somewhat. It is concluded that the two wave length determinations are in good agreement.

IV. The nuclear dye-content at different mitotic stages

Objects which are to be used for investigating quantitatively the Feulgen reaction should have as constant a DNA-content as possible. Prophase nuclei are ideal for the purpose if the two wave length method is employed for which non-uniformity of the dye-distribution is immaterial. Normal diploid prophase nuclei have presumably always the DNA-content 4C (see introduction), and they are found in sufficient number in any mitotically active tissue. Nuclei with irregular chromosome contents are apparently very rare in onion roots.

The prophase values obtained are given in Table 4. Pooling all sums of squares an over-all coefficient of variation of 5.5% was obtained for prophase nuclei. Metaphases also yielded the same value (Table 6).

In PATAU and SWIFT's (1953) data the largest deviations from constancy of the measured dye-contents are found at metaphase and mid-anaphase. For this reason the present post-prophase measurements were concentrated on these stages. Mid-anaphase is here understood

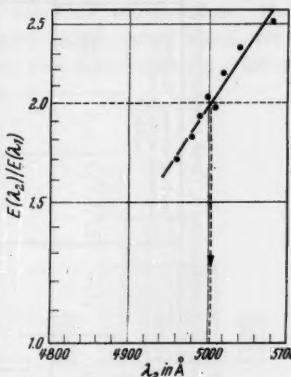


Fig. 3. Determination of λ_2
($\lambda_1 = 4800 \text{ \AA}$, see Table 3)

Table 4. Evaluation of measurements on 60 diploid prophasees, of which four replications ; (with nuclear mean') have been determined

as the condition which shows all or most sister chromatids separated from each other but not yet closely crowded at the poles. Metaphases were measured, without noticeable effect on the outcome, in polar view as well as in side view and anaphases always in side view as only such an orientation permits all chromosomes to be inside one section. In sections of $15\ \mu$ most metaphases and anaphases are cut and great care must be taken if such are to be avoided. It is not generally sufficient to establish a plasma layer above and below all chromosomes. The knife may still have removed one or more chromosomes which were lying somewhat apart. Several such cases were found with the missing

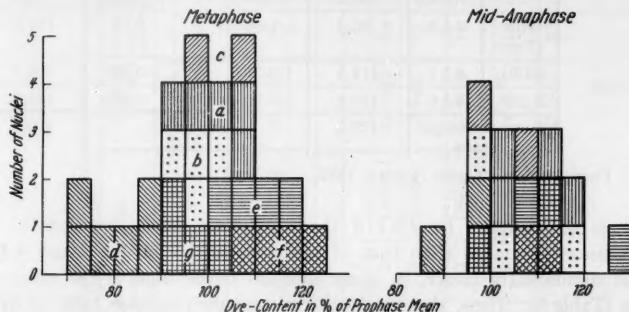


Fig. 4. Dye-contents of metaphases and anaphases (four replications each) in different samples. a: 1B 3, 5B 4; b: 4B 2; c: 4B 1; d: 2B 1, 3; e: 4A 6; f: 8A 1; g: 4A 3. For fixation, agent and duration of hydrolysis see Table 6

chromosomes turning up in the subsequent section. In most cases the chromosomes were actually counted. If this proved impossible, the metaphase or anaphase was selected only if the plasma layer on either side was of considerable thickness which presupposes that the chromosomes were lying close together, usually due to narrowness of the cell.

The results are summarized in Fig. 4 and Tables 5 and 6. Since various Feulgen procedures yield different nuclear dye-contents the values obtained from metaphases and anaphases are here expressed in percent of the mean dye-content of the prophase nuclei measured in the same slides. Thus comparisons are possible. Statistical tests have been made only with the more numerous metaphase data. It is obvious that the situation at mid-anaphase is essentially the same as that at metaphase, although the variation among anaphases of the same sample may be somewhat larger than that among metaphases. The metaphases yielded the same corrected coefficient of variation of 5.5% (Table 6) as prophase nuclei. However, the mean dye-contents of metaphases and anaphases, relative to the prophase values, vary appreciably from

Table 5. *Mean Feulgen dye-content of metaphases and anaphases as compared with that of prophase nuclei in same slides. Four replications per nucleus*

Fixation	Hydrolysis	Slide No.	Metaphase mean dye-content in % of prophase mean	Significance of difference in dye-content between metaphase and prophase			Mid-anaphase mean dye-content in % of prophase mean
				t min	d.f.	P ^a	
Acetic alcohol 1:3	HCl 6 min.	1B3 5B4	101.6	+ 0.44	10	0.7	107.6
	HCl 8 min.	4B2 4B1 2B1,3	97.2 101.4 80.2	- 1.18 + 0.89 - 5.88	7 2 11	0.3 0.5 <0.0002	104.8 99.3 92.0
	HCl 15 min.	4A3	95.9	- 1.68	7	0.17	107.0
	HCIO ₄	8A1	114.8	+ 5.31	7	0.001	109.1
Craf	H ₃ PO ₄	4A6	110.2	+ 4.36	7	0.003	118.5
	Mean of sample means		100.2				105.5

^a From graphical t-table (PATAU, 1943).

sample to sample. In 2B 1, 3 the metaphase mean dye-content is significantly smaller than that of prophase nuclei; in 8A 1 and 4A 6 it is significantly larger, in other samples both stages agree more or less (Table 5). These changes in the metaphase-prophase ratio of dye-content are by far too large for being ascribed to optical errors. Moreover, optical errors could change the ratio of the two means of measured values from the same two stages only if the intensity of staining had changed. Table 5, in conjunction with Table 4, shows that the same proportion is obtained with quite different prophase dye-contents (29.17 and 19.67) whilst a very different proportion may occur with the same prophase dye-content (19.63 and 19.87). Hence, there is a real variation in the metaphase-prophase ratio of dye-contents.

If this reflected a corresponding DNA variation it would mean that the DNA-content of nuclei passing from prophase to metaphase has decreased in certain samples and increased in others. It appears highly unlikely that the otherwise so well regulated process of mitosis should be accompanied by this sort of variation. It is rendered still more unlikely by the fact that the change, breakdown or synthesis of DNA, would largely be confined to the short period of transition from prophase to metaphase. Otherwise a relatively large change from stage to stage would be accompanied by an increase of the variation within one or both stages. There is no indication of this. Of the samples which show a major difference in DNA-content between prophase and metaphase, only one, 2B 1, 3, contains late prophase but these are very late. Their

Table 6. Evaluation of all measurements on metaphases (four replications each: γ_{ν} nuclear mean γ)

Fixation	Hydrolysis	Slide No.	n	Dye content sample mean \bar{y}	Observed variation between nuclei			Reading errors: Variation between replications per nucleus			Variation between nuclei after correction for reading errors	
					$\Sigma (\gamma - \bar{\gamma})^2$	d. f.	$s^2(\gamma)$	$\Sigma (\gamma_{\nu} - \bar{\gamma})^2$	d. f.	$s^2(\gamma_{\nu})/4$ = $s^2(\bar{\gamma})$	$s^2(\gamma_{\nu} - \bar{s}^2(\gamma))$ = $s^2(\bar{\gamma})$	corrected coefficient of variation
Acetic alcohol 1:3	NHCl 60° C, 6 min.	1B3	5	22.89	11.0176	4	2.7544	33.2363	15	0.5539	2.2005	6.5%
	4B2	4	19.11	1.9293	3							
	4B1	2	23.46	3.4061	1							
	2B1,3	6	18.34	9.0897	5							
	Total	12	19.45	14.4251	9	1.6028	35.8923	36	0.2493	1.3535	6.0%	
	NHCl 60° C, 15 min.	4A3	4	27.97	7.8012	3	2.6004	12.4423	12	0.2592	2.3412	5.5%
Craf	10% HClO ₄ 25° C, 24 hrs.	8A1	4	27.86	5.8862	3	1.9621	17.9159	12	0.3732	1.5889	4.5%
	70% H ₃ PO ₄ 25° C, 10 min.	4A6	4	21.63	2.5414	3	0.8471	24.0977	12	0.6020	0.3451	2.7%
	Total	29	22.68	41.6715	22	1.8942	123.5845	87	0.3551	1.5391	5.5%	

dye-contents, 21.56 and 22.78, do not differ significantly from those of five very early to middle prophases (ranging from $\gamma = 21.62$ to 24.53 with mean 23.17) although all six metaphases have appreciably lower values (from $\gamma = 16.72$ to 19.76 with mean 18.34). Direct evidence that the changes in the metaphase-prophase ratio of dye-contents are artificial is provided by the slides 4A 3 and 4A 6 which were hydrolysed differently but contained sections from the same sample of roots. They, nevertheless, display an apparently significant difference in their metaphase-prophase ratios of dye-contents.

Altogether it seems virtually certain that the variation of this ratio from sample to sample is not due to a corresponding variation of the DNA ratio but to varying proportionality errors. Unequivocal evidence of proportionality errors were provided by SRINIVASACHAR and PATAU (1959) with their experiments on SO_2 water. The apparent difference between the two samples 4B 1 and 2B 1, 3 indicates that the use of the same fixative and the same agent and duration of hydrolysis does not necessarily guarantee identical proportionality errors.

It had been hoped it might be possible to eliminate, or greatly to reduce, proportionality errors by means of the chromic acid in the Craf fixative. Chromic acid containing fixatives have been found to give Feulgen hydrolysis curves which have a plateau instead of a peak (BAUER, 1932; DI STEFANO, 1948). A plateau could be taken to indicate that all aldehyde groups have become available for staining (due to depurination of the DNA, DI STEFANO, 1948) while other processes (thymic acid degradation, DI STEFANO, 1948) involving their loss have not yet become effective¹. During this period at least one source of proportionality errors, viz. variation in the speed of such processes, would be excluded. Unfortunately the present Craf slides have a curve with a peak instead of a plateau (Fig. 5). This, of course, does not prove that the Craf fixative is incapable of producing a Feulgen hydrolysis curve with an extended plateau. The failure in the present case may have been due to a short duration of the fixation (one hour) being insufficient for the chromic acid to exert its full stabilizing effect. It remains to be seen whether the latter, resulting in a plateau of the Feulgen hydrolysis curve, can be had without also getting so much yellow stain in the tissue as to interfere with the photometric determination of the Feulgen dye-contents.

¹ DI STEFANO (1948), working with cartilage nuclei of *Rana*, found that even after 1:3 fixation "depurination is completed before loss of thymic acid begins". This certainly does not hold true in the present case. Although only two durations of hydrolysis were tried, six and eight minutes, it is obvious from Fig. 4 that the nucleal dye-content after 1:3 fixation never reached the amount obtained after Craf fixation. Since the 1:3 curve is known to have a clear peak, and since the present two values are very nearly the same, the peak was most likely between the two points as indicated in the figure.

At present it is quite impossible to predict the magnitude and direction of proportionality errors. The seven samples of Table 5 may, therefore, be considered as a selection which is random in regard to proportionality errors. The best available estimate of the DNA-content of metaphases relative to prophase is, hence, the mean of the seven percentages in Table 5 which is 100.2%. The corresponding estimate of the DNA-content at mid-anaphase is 105.5%. Both values are obviously not significantly different from 100%. PATAU and SWIFT (1953) had obtained 121.7% of the prophase mean for each of the two mid-anaphases, and 91.5 and 128.6% for two metaphases. Compared with the present data their values show rather extreme deviations from 100% and a discrepancy between the two metaphase values which goes far beyond the variation found here within any single sample. This seems to support PATAU and SWIFT's conclusion that these four measurements, having been made with a field size too large for their equipment, suffered from appreciable instrumental errors. Their measurements of two late anaphases, presumably optically more reliable, yielded (per daughter nucleus) a mean of 53.0% of the prophase mean. In the present study only one sample of four late anaphases was measured (2B 1, 3) which gave a mean of 44.3%. As to telophases PATAU and SWIFT determined three values with a mean of 98.2% of the prophase mean. The present measurements of (late) telophases were done on two samples of three nuclei each. From 2A 10 a mean of 59.9% of the mean of four prophase nuclei was obtained while 2B 1, 3 yielded 49.6% relative to the mean of seven prophase nuclei. In both cases the telophase values agreed well with those of early interphase nuclei.

In most of the present samples the observed differences in dye-content between mitotic stages are small, and all of these differences are within the limits of observed deviations between samples. These deviations are almost certainly proportionality errors. The data, with their entire lack of consistent changes in dye-content during mitosis, clearly support the assumption that the DNA-content does not change at all during the onion mitosis, apart from its halving brought about by the anaphase separation.

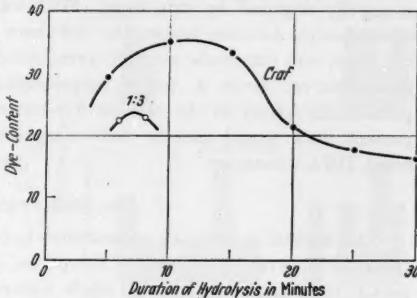


Fig. 5. Feulgen-hydrolysis curve after Craf fixation (each point: mean dye-content of four prophase nuclei, two replications each). Curve after 1:3 fixation conjectural, see footnote p. 420 (each point: seven prophase nuclei, four replications each)

In view of the occurrence of proportionality errors between stages, it would seem that some proportionality errors are also bound to occur between nuclei of the same stage. It has already been pointed out that optical errors, mainly those due to non-specific absorption could conceivably account for all of the variation found in prophase samples. The same applies to the metaphase samples which display the same variation as the former. The mid-anaphase values per sample seem to have been the result of a somewhat higher variation (Fig. 4) but that would hardly be surprising in view of the larger field size which is usually required by this stage. With increasing field size the field transmissions become larger, the influence of non-specific absorption increases, and our crude over-all correction for this absorption becomes less effective. Even if, rather surprisingly, there should be no proportionality errors in the nuclear dye-contents of the same stage, the present data would still be well compatible with the hypothesis of strict DNA-constancy.

V. The mitotic cycle

This section is based on measurements of three telophases, 21 interphases and seven prophanes. "Telophase" is here used to include all post-mitotic nuclei which still show unmistakable traces of the telophasic chromosome arrangement. Whether such traces can be seen depends, of course, in part, on the orientation of the nucleus. There is no sharp limit between very late telophase and early interphase. A nucleus which is at telophase by the above criterion always has a partner with apparently the same volume and dye-content. From each telophase pair only one nucleus was measured. Interphase nuclei were selected for measurement from several batches of relatively large cells of the future cortex. The only criterion of acceptance was their technical suitability. Hence, they can be considered as an approximately random sample with a slight bias in favour of small nuclei which are less likely to be cut. Telophase and prophase nuclei, being rarer, had to be included deliberately.

Of all the 31 nuclei not only the DNA-content but also the nuclear volume was determined as accurately as possible. The area, A , in μ^2 of the largest cross section of a nucleus was measured by a planimeter from a camera lucida drawing. The height, h , in μ was found as the average difference of four pairs of readings from the microscope fine adjustment screw. The volume in μ^3 was computed as $V = 2hA/3$.

If during mitosis an otherwise constant DNA-content is merely halved, the DNA-contents of diploid interphase nuclei must range from the telophase value, $2C$, to the amount, $4C$, characteristic of prophase nuclei, the intermediate values belonging to nuclei in the process of

DNA doubling. Such intermediates are generally found with an appreciable frequency in plant and animal tissues with a high mitotic rate (SWIFT, 1950a and b). The interphase development can be better understood by correlating DNA-content with nuclear volume (PATAU, 1952b). The advantage of this method becomes obvious when Figs. 6 and 7 are compared. The nuclear volume serves here as a sort of distorted time scale. The volume of meristematic nuclei increases during interphase, though not necessarily all the time, and continues to do so during prophase. The latter fact can be ascertained without any measurements when early, middle, and late prophases in similar cells are matched visually. In the present sample very early to early prophase nuclei ranged from 794 to $1109 \mu^3$, middle prophase from 903 to $1004 \mu^3$, and very late prophases from 918 to $1396 \mu^3$.

The more or less continuous increase of the nuclear volume during interphase is evidenced by its relation to the DNA-content (Fig. 7). The smallest nuclei are 2C. In the medium volume range the DNA-content displays a positive regression on volume. The very largest nuclei, approaching the volume of early prophase nuclei, are 4C. It should be added that these generalizing statements have a broader basis than is indicated by the number of measured nuclei. The human eye is quite capable of detecting relatively small differences in dye-content in nuclei of similar structures. Using late telophase nuclei on one side, and early prophase nuclei on the other, as reference points of known DNA-content, it becomes possible to classify visually interphase nuclei, fairly reliably, as being "2C or low intermediates", "intermediates", or "4C or high intermediates". In the present study, enough nuclei were matched visually for feeling assured that the measurements given in Fig. 7 are typical for the general situation in the most actively dividing parts of the meristem in healthy roots.

Fig. 7 confirms for onion the earlier finding on the interphase development in root meristem. Each nucleus passes through an interphase I with the DNA-content 2C, a period of DNA synthesis (interphase II), and an interphase III with the DNA-content 4C. In mitotically active onion meristem all these phases, judged by their frequencies, have comparable duration interphase I possibly being the shortest. If the

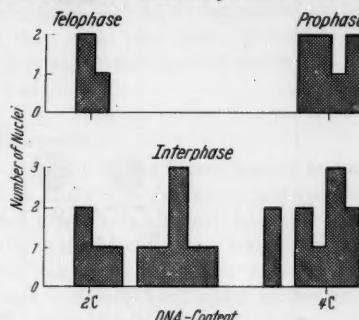


Fig. 6. Slides 2B 1, 3 (each nucleus four replications)

duration of the mitotic cycle in onion is anywhere near 24 hours¹, each of the three phases must last at least several hours. This agrees well with PELC and HOWARD's (1952) conclusion from autoradiograph data: what is called here interphase III lasts about six to eight hours in *Vicia*.

Fig. 7 shows that the beginning of the DNA synthesis is not confined to nuclei of a narrow size class. Well advanced intermediates appear already in nuclei of about $411 \mu^3$ and the first 4C nucleus has a volume

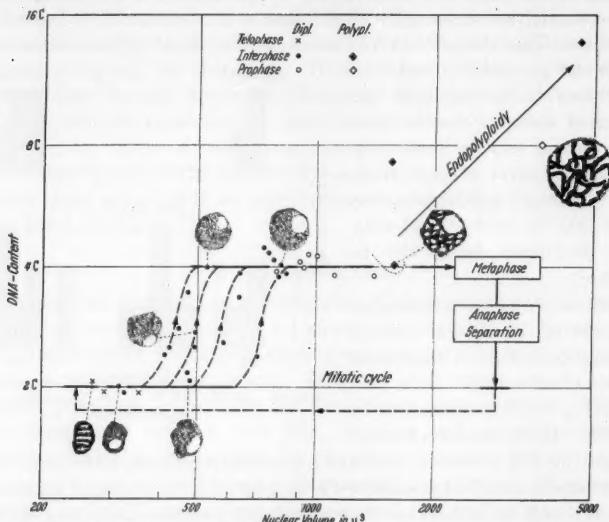


Fig. 7. Slides 2B 1, 3 (DNA value of each nucleus: mean of four replications). Diploid nuclei same as in Fig. 6.

of only $523 \mu^3$. On the other hand, the largest apparent 2C nucleus measures $479 \mu^3$, the largest intermediate nucleus $704 \mu^3$. Obviously the increase curves are rather steep. This contrasts with the considerable time required for DNA synthesis as revealed by the frequency of intermediates. It is, therefore, concluded that during interphase II the volume increase, if any, is slow. On the other hand small 4C nuclei seem to be rare compared with the frequency of 4C nuclei of a size approaching that of early prophase nuclei. It appears that nuclei of interphase III have the highest rate of volume increase in the beginning of this period.

¹ GRAY and SCHOLES (1951) determined about 22 hours for this duration in the active meristem of *Vicia*. LAUGHLIN (1919) has claimed a much shorter duration for the onion mitosis but his data though extensive, are considered statistically not conclusive in this respect.

The above relations could be studied in more detail by a frequency analysis of a large number of accurately measured interphase nuclei. The word "accurately" needs emphasizing. A large sample of inaccurately measured nuclei could be very misleading in regard to these details. It could reliably show only the mere existence of a correlation between DNA-content and nuclear volume but this can be established by a small sample of accurate measurements just as well. Numerous inaccurate values could easily suggest a regression curve which would in no way represent the actual relation between nuclear DNA-content and volume. In the present case the four replications each of 21 interphase nuclei clearly yielded more information than could have been obtained from 84 nuclei if merely single replications and cruder approximations of the nuclear volume had been determined.

D. Discussion

The factor which limited the accuracy of the determination of the nuclear dye-content in the present study was doubtless, non-specific absorption for which only a rather crude over-all correction appeared feasible. It is not so much the amount of deflecting and absorbing material through which the light has to pass but the non-uniform distribution of this material, plasma, cell walls etc., which render any over-all correction fall short of the satisfactory.

The DNA measurements, as outlined here, were made on two other objects which are technically more favourable than sectioned onion roots. The one investigation (by OWCZARZAK and PATAU, unpublished) was done on salivary gland nuclei of *Drosophila* and the other (by PATAU, unpublished) on human spermatozoa. In the latter case non-specific absorption could be expected to be negligible. In view of the smallness, accessibility, and similarity in shape and texture of these nuclei it could further be expected that proportionality errors between nuclei would be very small. Indeed, it turned out that the whole observed variation between measured dye-contents of nuclei with equal chromosome complements was fully accounted for by the non-systematic reading errors. In other words, the corrected coefficient of variation was zero. In the case of salivary glands non-specific absorption was not negligible, but since it was due to fairly uniform layers of plasma its effects on measurements could presumably be kept lower than in the present study. The corrected coefficient of variation proved to be about 2.5% as compared with 5.5% in onion prophase nuclei and metaphases.

At least a considerable part of the observed variation in these cases must have been due to errors arising from non-specific absorption. The fact in the three, methodologically strictly comparable investigations the corrected coefficient of variation is inversely related to the technical

suitability is suggestive. This would be the relation, if the apparent variations were wholly artificial. At any rate, the present data, those from *Drosophila*, and still more so those from sperm, leave only such a narrow margin for a natural DNA variation that we may wonder whether the cell could regulate the amount of any substance so accurately around an optimal value unless this substance were part of, or formed by itself, a constant self-reproducing, molecular structure. Such a structure could hardly be anything but the gene, or at least a constant templet upon which the physiologically active gene is formed. In that case the latter might as well be called the first gene product, and the templet the gene.

Such speculations can at present be advanced only tentatively. They may well gain firmer ground, if further accurate measurements of the DNA-contents of technically favourable nuclei should consistently lead to very low upper limits for the DNA variation. High accuracy of the measurements is essential, for only thus could a continuous DNA variation around an approximately constant optimum conceivably be rendered unlikely enough for giving weight to the hypothesis of strict DNA-constancy¹ with its bearing on the nature of the gene. Of course, even the already amply evidenced approximate DNA-constancy per genome, whether it makes strict constancy or not, suggests a genetic importance of this substance. The majority of published DNA measurements (see reviews by SWIFT, 1953; VENDRELY and VENDRELY, 1956) point to the same direction as genetic experiments on *pneumococci* and the recent work with radioactive isotopes on phages (for reviews see MIRSKY, 1951; STENT, 1953). Claims of major deviations from DNA-constancy, found in literature, are inconclusive as their validity rests on the implied assumption that proportionality errors are negligible or absent.

If awareness of the possibilities of systematic errors in this field is needed, there is need for statistical commonsense. The fact that systematic errors do occur which at present cannot always be avoided does in no way justify to deny the power of a method which in so many cases has consistently produced results of such close agreement with simple and biologically meaningful numerical relations that any attempt to explain them as chance outcome of a faulty method would imply the most improbable series of coincidences. Thus in the present study only one prophase nucleus was found in which the chromosomes had four instead of two chromatids. The DNA-content was determined as

¹ It need hardly be said that the term "constant" is here understood to exclude continuous variation around an optimum but not discontinuous variation by way of accidents such as chromosome breaks, irregularities in strand reproduction, etc.

2×23.17 as compared with 22.88 ± 0.44 , the mean of seven diploid prophase nuclei. This in turn, compares with $22.69/2$, the mean of three telophase nuclei. This example of agreement with an expected 1:2:4 series is more typical for the outcome of careful measurements than those few which show appreciable proportionality errors.

Summary

The techniques of making and evaluating measurements of nuclear DNA-contents by the two wave length method, including wave length determination were worked out. The efficiency of the analysis increased by "unbiased elimination of off-values". Correction for non-specific absorption was made but remained, with the present material (sections), necessarily imperfect. This seems to be the factor which limited the, otherwise apparently very high, optical accuracy of which instrument and methods are capable. Errors in the determination of the nuclear dye-content were, even so, small compared with the more extreme cases of proportionality errors in the determination of the DNA-content that resulted from disproportionality of Feulgen dye- and DNA-content.

Direct evidence of proportionality errors entering the DNA determination was found when different mitotic stages were compared. The ratio of mean dye-contents of two stages varied in slides which were prepared differently in regard to fixation, hydrolysing agent, or duration of hydrolysis. In seven such samples the mean dye-content of metaphases ranged from 80 to 115% (with mean 100.2%) of the prophase mean, the mean dye-content of mid-anaphases from 92 to 112% (with mean 105.5%). Similarly the mean dye-contents of daughter nuclei in late anaphases and telophases bracketed 50% of the prophase value. It appears virtually certain that this variation is not caused by a corresponding natural DNA variation but is due to proportionality errors.

The results strongly support the view that the DNA-content does not change at all during mitosis apart from its halving brought about by the anaphase separation of sister chromatids. The results are further fully compatible with the hypothesis that the DNA-content per complete genome is strictly constant except during the period of DNA doubling. The dye-contents of prophase nuclei (also of metaphases) of the same sample have a coefficient of variation (corrected for non-systematic reading errors) of about 5.5%. This appears to be well within the limits of errors due to imperfectly corrected non-specific absorption and of proportionality errors.

The proportionality errors found in measurements of different mitotic stages reveal a pattern similar to that prevailing in published DNA measurements: apparent deviations from DNA constancy are

usually small and often negligible, but are occasionally large enough to be misleading. None of the claimed disproofs of DNA constancy is in any way conclusive, as such claims necessarily rest upon the unwarranted assumption that proportionality errors are always very small or absent.

The development of the DNA-content during interphase was studied by correlating DNA-content and nuclear volume. Earlier findings on roots of other plants are confirmed. An interphase I with the DNA-content 2C is followed by a period of DNA synthesis (during this period the nuclear volume seems to increase only slowly, if at all) and this by an interphase III with the DNA-content 4C. Each phase lasts several hours. Mitosis and DNA synthesis are essentially independent processes.

Measurements on nuclei which are technically more favourable than those in sectioned onion roots have yielded a smaller or even disappearing inter-nuclear variation of the Feulgen dye-content. A strict DNA constancy per complete genome appears more and more likely.

Literature cited

- BAUER, H.: Die Feulgensche Nuklealfärbung in ihrer Anwendung auf cytologische Untersuchungen. *Z. Zellforsch.* **15**, 225—247 (1932).
- DI STEFANO, H. S.: A cytochemical study of the Feulgen nucleal reaction. *Chromosoma (Berl.)* **3**, 282—301 (1948). — Feulgen hydrolysis with perchloric acid. *Stain Technol.* **27**, 171—174 (1952).
- GRAY, L. H., and M. E. SCHOLES: The effect of ionizing radiations on the broad bean root. VIII. Growth rate studies and histological analyses. *Brit. J. Radiol.* **24**, 82—92 (1951).
- HASHIM, S. A.: Feulgen hydrolysis with phosphoric acid. *Stain Technol.* **28**, 27—31 (1953).
- LAUGHLIN, H. H.: Duration of the several mitotic stages in the dividing root-tip cells of the common onion. *Carnegie Inst. Publ.* **265** (1919).
- MIRSKY, A. E.: Some chemical aspects of the cell nucleus. *Genetics in the 20th Century*, p. 127—153. MacMillan & Co., New York 1951.
- ORNSTEIN, L.: The distributional error in microspectrophotometry. *Lab. Invest.* **1**, 250—262 (1952).
- PATAU, K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen. (Eine neue t-Tafel.) *Biol. Zbl.* **63**, 152—168 (1943). — Absorption microphotometry of irregular-shaped objects. *Chromosma (Berl.)* **5**, 341—362 (1952a). — The DNA-content of nuclei in root tips of *Rheo discolor*. *Rec. Gen. Soc. Amer.* **21**, 56 (1952b). —, and H. SWIFT: The DNA-content (Feulgen) of nuclei during mitosis in a root tip of onion. *Chromosoma (Berl.)* **6**, 149—169 (1953).
- PELC, S. R., and A. HOWARD: Techniques of autoradiography and the application of the stripping-film method to problems of nuclear metabolism. *Brit. med. Bull.* **8**, 132—135 (1952).
- PERSIDSKY, M. D.: A vibratory microtome for sectioning living tissue. *J. Lab. clin. Med.* **42**, 468—471 (1953).

- SRINIVASCHAR, D.: The DNA-content of nuclei in the meristem of onion roots. Ph. D. Thesis, University of Wisconsin 1953.
- , and K. PATAU: Proportionality between nuclear DNA-content and Feulgen dye-content. *Exp. Cell Res.* 286—298 (1959).
- STENT, G. S.: The multiplication of bacterial viruses. *Sci. Amer.* 188, 36—39 (1953).
- STOWELL, R. E.: Feulgen reaction for thymonucleic acid. *Stain Technol.* 20, 45—58 (1945).
- SWIFT, H.: The desoxyribose nucleic acid content of animal nuclei. *Physiol. Zool.* 23, 169—198 (1950a). — The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 36, 643—654 (1950b). — Quantitative aspects of nuclear nucleoproteins. *Int. Rev. Cytol.* 2, 1—76 (1953).
- VENDRELY, R., and C. VENDRELY: The results of cytophotometry in the study of the desoxyribonucleic acid (DNA) content of the nucleus. *Int. Rev. Cytol.* 5, 171—197 (1956).

Dr. D. SRINIVASCHAR
Central Potato Research Institute
Simla (Punjab), India

From the Department of Genetics, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin,
and the Biology Department, Brookhaven National Laboratory, Upton, New York

CHROMATIN EXTRUSION AND DNA TRANSFER DURING MICROSPOROGENESIS*

By

STEPHEN T. TAKATS**

With 10 Figures in the Text

(Eingegangen am 26. März 1959)

I. Introduction

Results recently obtained by LINSKENS (1958) on the presence of free nucleic acid bases and nucleotides in anthers of *Lilium henryi* have been interpreted by him to indicate participation of tapetal products during the early stages of microsporogenesis. This idea modifies the hypothesis of COOPER (1952) for the transfer of DNA from the tapetum to the developing microsporocytes. COOPER observed that chromatin globules arose in association with tapetal nuclei during leptotene and zygotene, then moved through the walls of the tapetal cells to a position peripheral to the sporogenous tissue. At zygotene and pachytene they became associated with the microsporocyte nuclei in the interior of the sporogenous tissue.

The presence of such extranuclear chromatin associated with a variable proportion of microsporocytes during early prophase was first described by KÖRNICKE in 1901. Many reports thereafter substantiated it as an anomaly peculiar to zygotene in microsporogenesis of plants from mosses to angiosperms (see WEST and LECHMERE 1915; GATES and REES 1921). The chromatin globules might be on the outer periphery of the microsporocyte nucleus, free in the cytoplasm or attached to the nucleus by a fine chromatin strand. Using ultraviolet absorption and Feulgen staining, SPARROW and HAMMOND (1947) showed that the globules contained DNA.

Various explanations have been given for the presence and function of these globules. Usually without experimental justification they have

* Paper No. 629 from the Department of Genetics, University of Wisconsin, Madison. This work has been supported largely by grants to Dr. D. C. COOPER from the Research Committee of the Graduate School of the University of Wisconsin from funds supplied by the Wisconsin Alumni Research Foundation. During 1955—1956 the author was a Postdoctoral Public Health Service Research Fellow of the National Cancer Institute.

** Postdoctoral Public Health Service Research Fellow of the National Cancer Institute. A small part of the work reported here was carried out at Brookhaven National Laboratory under the auspices of the U. S. Atomic Energy Commission.

been considered artifacts, signs of degeneration, or part of a normal process. Almost invariably they were considered to originate from the nucleus of the microsporocyte. The present studies were undertaken to reexamine these discrepant views in the light of COOPER's findings. The results do not agree with those of COOPER and give no support to the chemical findings of LINSKEENS. It is proposed that most of the extranuclear chromatin globules may be explained as artifacts of handling and fixation.

II. Materials and Methods

Male-sterile and male-fertile lines of *Allium cepa*, a diploid clone of *Tradescantia paludosa*, and *Hemerocallis fulva* were used for initial observations; later work was done with *Trillium erectum*. Most of the results to be reported were obtained with *Lilium longiflorum* var. CROFT. In *Lilium*, the anthers within a bud develop synchronously, so that each bud provides six anther-samples of a population of cells spanning a certain period of meiosis. Moreover, there is a close correlation between bud length and stage of meiosis (ERICKSON 1948).

The *Trillium* rhizomes were kept in moist sphagnum moss at about 3° C until used. *Lilium* bulbs were stored at the same temperature in moist peat moss in polyethylene bags. Before planting, bulbs were soaked in a solution of commercial fungicide ("Parzate": 0.4 oz./gal. water at 110° F, 1 hr.); greenhouse temperatures were kept between 65—70° F, and dilute ammonium nitrate solution was given to the growing plants periodically.

Only fixed and frozen material was studied. Whole buds with and without perianth, whole anthers and various-sized pieces of anthers were fixed. Pectinase digestion (CHAYEN 1952) prior to fixation gave better separation of cells in some of the *Allium* smears and squashes. A variety of fixatives were used:

1. Carnoy (3 vols. 95% ethanol, 1 vol. glacial acetic acid).
2. Craf (5 vols. 1% chromic acid, 3.5 vols. 10% glacial acetic acid, 1.5 vols. 37% formaldehyde).
3. FAA (9 vols. 70% ethanol, 0.5 vol. glacial acetic acid, 0.5 vol. 37% formaldehyde).
4. Flemming (BAKER's modification: 15 vols. 1% chromic acid, 4 vols. 2% osmium tetroxide, 1 vol. glacial acetic acid).
5. Formaldehyde (BAKER's modification: 3.7% aqueous formaldehyde with 1% calcium chloride).
6. Osmium tetroxide (1% in pH 7.4 acetate-veronal buffer).
7. Newcomer (6 vols. isopropyl alcohol, 3 vols. propionic acid, 1 vol. petroleum ether, 1 vol. acetone, 1 vol. dioxane; see NEWCOMER 1953).

Fisher formaldehyde without methanol preservative was used. All material fixed in formaldehyde or osmium-containing mixtures, as well as that from Newcomer was afterwards washed in running water for a period at least equal to the length of time of fixation. The Newcomer material to be used for smears and squashes was stored in the fixative at about 6° C; all other material for the same purpose was stored at the same temperature in 70% ethanol.

The "freezing-substitution" method was used essentially as in other laboratories (RUSSELL et al. 1949; Woods and POLLISTER 1955) but was satisfactory only with very small pieces of tissue ca. 1 mm long cut from an anther with a razor blade. These pieces were immediately put into a quenching mixture of butane-saturated isopentane cooled with liquid air until just viscous. After a few minutes they were quickly transferred to tubes of absolute ethanol precooled with powdered dry-ice

in ethyloxalate, the whole maintained in a dewar until dehydration was presumed complete. The tubes were then allowed to come to room temperature and the material embedded, using cedarwood oil as the intermediate solvent. Sections were fixed in ethanol following removal of paraffin with xylene.

Tissues were routinely stained by the Feulgen reaction, and sometimes counterstained with fast green; non-hydrolyzed control slides were processed simultaneously. Protein was determined with mercuric bromphenol blue, according to MAZIA et al. (1953).

The nucleic acids of *Lilium* buds were labelled with tritium by immersing the anthers on the plant for 24 hrs. directly in a mineral solution (TAYLOR 1950) containing 20–30 μ c/ml of H^3 -cytidine, specific activity ca. 247 mc/mM or 360 mc/mM. (The former specific activity refers to cytidine made and kindly supplied by J. H. TAYLOR, Columbia University; other lots were purchased from Schwarz Laboratories, Inc.) The perianth of a bud is replaced with an artificial sac containing the solution. Cytidine enters the anthers by way of the vascular system and labelling proceeds with time from the base to the tip of an anther (TAKATS 1958, unpublished). Sections of anthers were cut at 5 μ and extracted on the slide with 2% perchloric acid for 40 minutes at 2–4° C to remove acid-soluble materials, or with 10% perchloric acid for 2 and 4 hrs. at 20° C to remove 80–90% of the RNA without removing DNA (Woods 1957; Woods 1958, unpublished). The Feulgen reaction was carried out after hydrolysis with 1 NHCl at 60° C for 8 or 10 minutes. Kodak AR-10 stripping film was applied to the slides and they were processed essentially as outlined by TAYLOR (1956).

III. Results

1. Sporogenous tissue

Chromatin globules associated with the microsporocytes are present only during the stages zygogene and pachytene. The frequency of affected microsporocytes changes strikingly during this time. Data were obtained for the prophase stages in *Lilium* by scoring longitudinal sections of anthers. In Fig. 1 the frequency data of Table 1 are plotted against the logarithm of bud length. The latter has been shown to vary linearly with time (ERICKSON 1948). A nearly symmetrical curve results: after an initial lag, the frequency rises steadily to a maximum and then abruptly falls off as pachytene begins. At the maximum, usually less than 20% of the microsporocytes in an anther are affected. The period of increase corresponds to zygogene and is slightly shorter than the period of decrease; the entire interval covers about 3 $\frac{1}{2}$ days. The rather large errors associated with the values are due primarily to the non-random distribution of affected cells in the cross-sectional plane of the locule. Variation in frequency between locules of a single anther is not significantly different from that for the 6 anthers of a bud.

If some of the same anthers are now rescored, counting only the microsporocytes from the tip or base, two curves are obtained slightly displaced with respect to time (Fig. 2). The affected microsporocytes at the tip of the anther actually reach a maximum frequency before those at the base, although the intervals between bud lengths scored

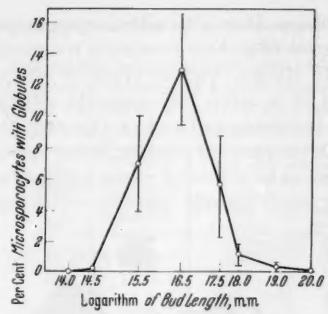


Fig. 1

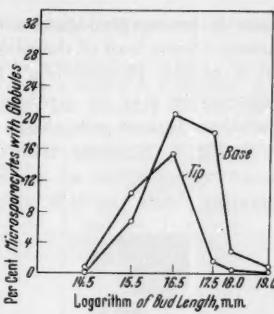


Fig. 2

Fig. 1. Frequency of microsporocytes with chromatin globules during first meiotic prophase of *Lilium*. Data are plotted from Table 1. Bars show standard deviations

Fig. 2. Frequency of microsporocytes with chromatin globules: tip and base of anthers in Fig. 1. Apical and basal frequency curves are based on the means of 4 samples of 200 cells at each stage

were not appropriate to show this. The shift in frequency with time reflects the developmental gradient in each locule of the anther; cells at the base lag about 12 hours behind those at the tip.

Table 1. Frequency of microsporocytes with chromatin globules during first meiotic prophase. *Lilium*

Anthers were excised from buds and fixed 1-2 hrs. in Carnoy. Each percentage value represents the mean \pm standard deviation of a number of locule values; each of these was obtained from 700-1000 cells in a Feulgen-stained median longitudinal section (except 12 values at 15.5 mm, obtained from serial cross-sections).

Bud length mm	Stage of sporogenous tissue and tapetum		Per cent microsporocytes with globules	No. locules scored	No. anthers sampled
	Base	Tip			
14.	E. Leptotene Tapetum uninucl.	Leptotene Tapetum uninucl.	0.0 \pm 0.0	8	5
14.5	E. Leptotene Tapetum uninucl.	E. Zygote Tapetum uninucl.	0.11 \pm 0.12	12	6
15.5	E. Zygote Tapetum uninucl.	Zygote Tapetum uninucl.	6.88 \pm 2.99	16	6
16.5	Zygote Tapetum uninucl.	E. Pachytene Tapetum uninucl.	12.90 \pm 3.59	15	6
17.5	Pachytene Tapetum uninucl.	Pachytene; Tapet. div. or binucl.	5.46 \pm 3.27	12	6
18.0	Pachytene Tapetum uninucl.	Clumped pachytene Tapet. div. or binucl.	1.0 \pm 0.73	14	6
19.0	Pachytene; Tapet. div. or binucl.	Clumped pachytene Tapetum binucl.	0.25 \pm 0.31	18	6
20.0	Clumped pachytene Tapetum binucl.	Clumped pachytene Tapetum binucl.	0.0 \pm 0.0	15	6

There is no morphological evidence that affected microsporocytes degenerate. Some trail of the progress of globule formation is expected if it is a natural phenomenon. In *Allium*, various types of affected microsporocytes may be arranged in a series that suggests ultimate degeneration; typical cells at the beginning and end of this series are shown in Fig. 3. However, their developmental relation is not certain. The more extreme types are present only in locules whose contents are degenerating, while the cells with small discrete globules which arise

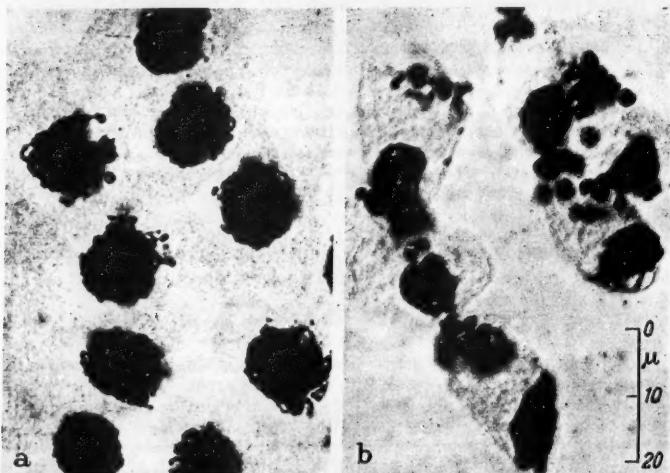


Fig. 3a and b. Typical microsporocytes associated with chromatin globules in *Allium*. Smears of Newcomer-fixed anthers: (a) from normal locules, (b) from degenerating locules. Magnification ca. 1050 \times

from an apparently normal nucleus occur only in normal locules. Complete serial sections of 15 buds give no convincing evidence of transitional stages within a locule. The difference in cell types is not correlated with meiotic stage, and is taken to mean that a sudden irreversible change initiates degeneration.

Similar locule-specific differences do not occur in *Lilium*. The material was examined for cells that showed extruded nucleolar fragments and for pycnotic cells, taking both types as indicators of degeneration. The frequencies of both vary in parallel with the frequency of cells associated with chromatin globules (Table 2). This indicates that all three may be aspects of the same cellular change. The degenerative types do not accumulate, however, which would be expected if the process were one of progressive degeneration. Their frequencies throughout zygotene and pachytene remain extremely low.

Table 2. Degeneration of microsporocytes correlated with presence of chromatin globules. *Lilium*

The per cent microsporocytes with globules is taken from Table 1. Each of the other values is the mean of 4 locule values derived from 3 or 4 anthers. A microsporocyte was scored as pycnotic if its nucleus was shrunken and the chromatin markedly homogeneous in comparison with other microsporocytes.

Bud length mm	Per cent microsporocytes with globules	Per cent microsporocytes pycnotic		Per cent microsporocytes extruding nucleolar fragments	
		with globules	without globules	with globules	without globules
15.5	6.88	0.03	0.03	0.82	0.14
16.5	12.90	0.2	0.04	1.30	0.30
17.5	5.46	0.0	0.0	0.75	0.17
18.0	1.04	0.0	0.03	0.13	0.06
19.0	0.25	0.0	0.0	0.04	0.04
20.0	0.0	—	0.0	—	0.0

It is possible that affected cells break down so rapidly that there is no accumulation of obviously degenerating types, or so slowly that prophase stages are not affected. With respect to the second possibility, examination of post-prophase stages in *Lilium* gives no evidence of degeneration; these stages occur rapidly enough so that even if only a small number of cells were affected at any one time, they would accumulate and be detected. Rapid cell loss was checked by scoring median longitudinal sections of locules at different stages during early prophase. This was done by sampling anthers from a bud at different times. By analysis of variance of cell number in all the anthers of a bud it was found that at a given stage different anthers could be used as samples from a homogeneous population. A normal growth rate is maintained during sampling intervals up to 48 hours. Data are presented in Table 3 for three buds sampled over 24, 48, and 60 hours. The time-frequency curve in Fig. 1 does not give information on the cumulative proportion of cells affected, so that the expected cell loss on the hypothesis of degeneration can not be estimated. However, the maximum frequency may be taken as a minimum figure; a drop in cell number greater than about 13% would then indicate degeneration of affected cells. Linear regression coefficients of the number of microsporocytes against time are given in Table 3. Since none of these differs significantly from zero, there is no basis for concluding that the cell number changes from its initial value.

2. Tapetum

The extrusion of chromatin globules from tapetal nuclei does not occur as a regular process in any of the material, nor is there a peripheral distribution of globules around the sporogenous tissue at any stage of meiotic prophase. Such a distribution might indicate a movement of globules away from the site of origin, and was so interpreted by COOPER

Table 3. Correlation between frequency of microsporocytes with chromatin globules and total number of microsporocytes. *Lilium*. Each locule section was corrected for the increase in locule diameter with time, so that it represents a constant fraction of the locule volume. Expected final bud lengths (in parentheses) are given to the nearest 0.5 mm. The linear regression of the number of microsporocytes on time is given for each experiment.

Time, hrs.	No. microsporocytes per locule section	Percent microsporocytes with chromatin globules	Time, hrs.	No. microsporocytes per locule section	Percent microsporocytes with chromatin globules	Time, hrs.	No. microsporocytes per locule section	Percent microsporocytes with chromatin globules	
0 = 15.5 mm	853 785	819 3.66	3.20 3.43	0 = 15.0 mm	858	1.4	0 = 15.0 mm	773	2.8
4	870 840	840 3.12	2.66 2.89	12	828	13.1	12	945	14.8
10	785 751	769 18.30	12.95 15.63	24	868	3.7	24	768	17.2
16	891 721 920	856 10.33 11.26	8.20 19.53 11.26	36 48 (= 18.5 mm)	885 903 868	4.2 4.5 0.0	36 60 (= 19.5 mm)	841 639 885	25.1 1.1 0.1
24 (= 17.0 mm)	911 869	890 13.41	20.30 16.86	$b \pm s_b = 0.76 \pm 0.64$		$b \pm s_b = -1.02 \pm 1.86$		$b \pm s_b = 2.80 \pm 2.18$	

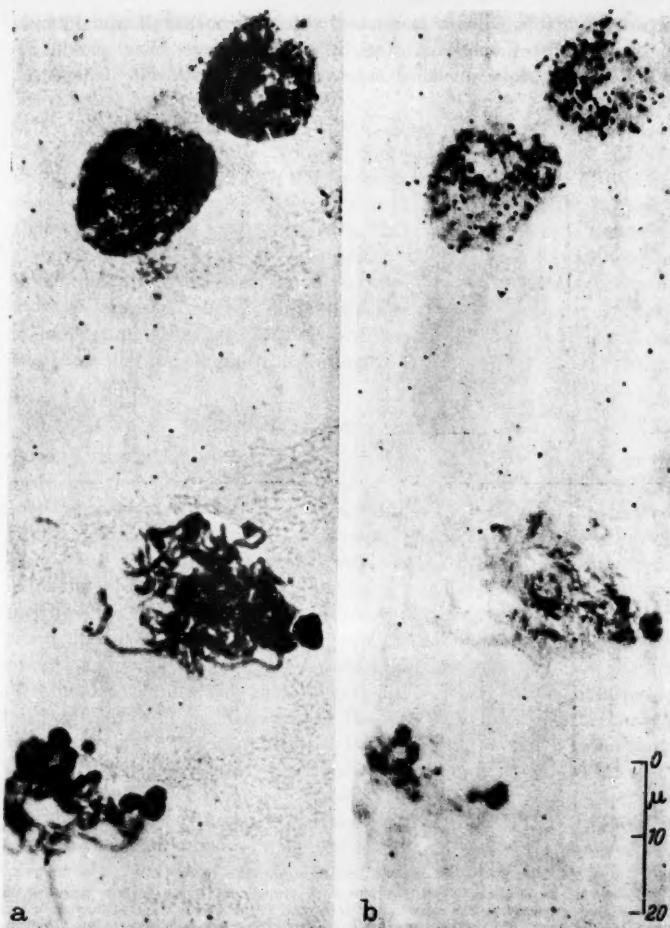


Fig. 4a and b. Autoradiograph of tapetum and sporogenous tissue at early pachytene in *Lilium*, after labelling with $\text{H}^3\text{-cytidine}$ during the preceding 24 hours, when the tapetum is synthesizing DNA. Feulgen hydrolysis and staining, showing label in tapetal DNA: (a) focal level of tissue, (b) focal level of emulsion. Chromatin globules associated with the microsporocyte nuclei are not labelled. Magnification ca. 1200 \times

(1952). *Lilium* buds in which there is a base- to-tip gradation in stage, from leptotene to very early zygotene, give critical evidence on this point. At the tip of each locule a few microsporocytes show the charac-

teristic chromatin globules associated with their nuclei. If the globules arise from tapetal nuclei at a slightly earlier stage, they should be associated with these nuclei at a lower level in the locule. They are,

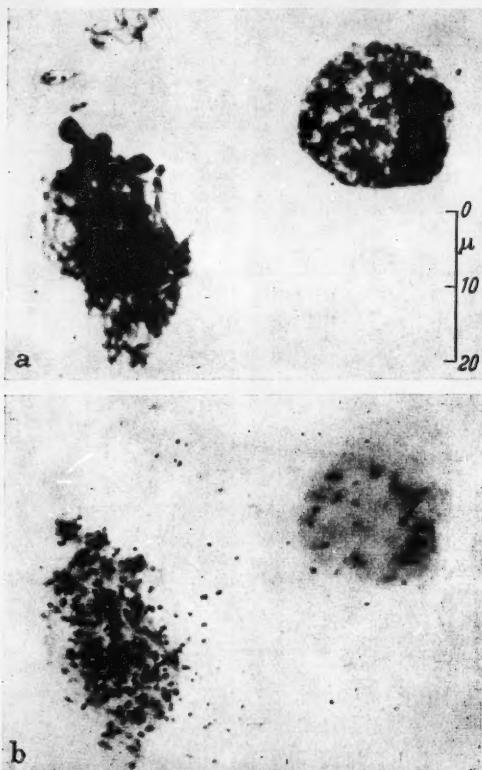


Fig. 5a and b. Autoradiograph of tapetum and sporogenous tissue at late zygotene in *Lilium*. Anthers were labelled prior to leptotene with $\text{H}^3\text{-cytidine}$. The treatment solution was then withdrawn, the anthers washed, and allowed to grow to late zygotene. Feulgen hydrolysis and staining, showing label in the microsporocyte DNA: (a) focal level of tissue, (b) focal level of emulsion. Chromatin globules associated with the microsporocyte nuclei are labelled. Magnification ca. 1200 \times

however, not present at that level. Occasional extrusion of chromatin globules from tapetal nuclei occurs in *Allium*, but is limited to the final stages of meiosis and may only presage the subsequent normal breakdown of the tapetum.

Direct evidence on the site of origin of the globules was obtained in *Lilium*, taking advantage of the separation in time of DNA synthesis for the tapetum and the sporogenous tissue. Complementary experiments were carried out by labelling the nuclear DNA of one or the other tissue with H^3 -cytidine. Typical results are shown in Figs. 4 and 5. The correspondence between microsporocyte nuclei and globules, and the lack of correspondence between tapetal nuclei and globules with respect to labelling indicates that the globules arise from the microsporocytes and not from the tapetum. It is unlikely that the unlabelled globules observed when the tapetum is labelled could have originated from tapetal nuclei before the latter were labelled. Three experiments were performed at slightly different times during anther development, to bracket the interval of DNA synthesis in the tapetum; in no case was there any labelling of the chromatin globules.

3. Handling effects on extrusion

An indication that injury could produce a localized increase in the extrusion frequency was first obtained when entire buds of *Trillium* were reconstructed from serial cross-sections. Subsequently, a number of experiments with *Lilium* demonstrated that any injury rupturing the locule wall prior to fixation will produce the typical microsporocytes extruding chromatin globules. Cutting or puncturing the anther always increases the frequency as well as the severity of extrusion, in a gradient toward the point of injury. The extruded globules are clearly oriented toward the point where the locule was injured; this is the usual pattern of response. Similar extrusion is produced regularly when small pieces are cut from anthers (Figs. 6—8). The effect is the same whether the tissue is fixed or frozen, indicating that extrusion is not a response to fixation. Presumably the osmotic shock on cutting induces extrusion. Cells in frozen pieces differ from those in Carnoy-fixed comparison pieces only by their more homogeneous nuclear contents. Usually a lower frequency of extruding cells is produced if the anther is immersed in Carnoy while it is cut into pieces, instead of being cut in air and then immersed (Table 4, p. 443).

Cells distal to a point of injury are indistinguishable from those in uninjured locules if the material is fixed immediately after injury. If fixation is delayed, all the cells in the locule very rapidly disintegrate. The microsporocytes typically become enucleate or pyknotic, with vacuolate cytoplasm and distorted membranes. Large globules with some internal chromonematic structure are frequently extruded. Enucleation is the end result of this induced extrusion, the chromatin frequently entering the cytoplasm of an adjacent microsporocyte. Early stages,

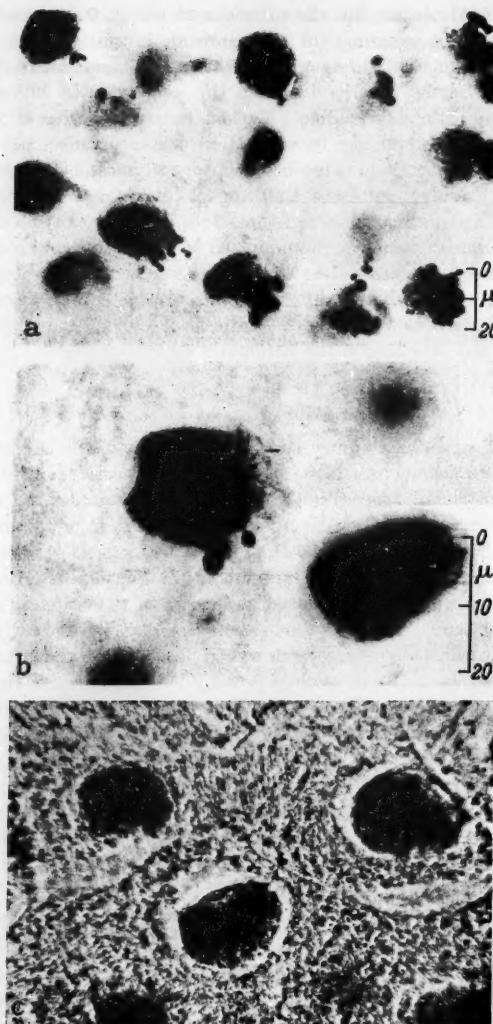


Fig. 6a—c. Extrusion of chromatin globules from microsporocyte nuclei in frozen-dried piece of anther, *Lilium*, leptotene, 14.0 mm bud. Note in (a) oriented extrusion produced by cutting; cut surface is to right. Phase-contrast photograph (c) shows penetration of extruded chromatin into cytoplasm of adjacent cell more clearly than in (b). Magnification ca. 470 \times (a) and ca. 1050 \times (b) and (c)

however, perfectly simulate the extrusion occurring in uninjured locules. The cells are morphologically the same in both cases. The extruded

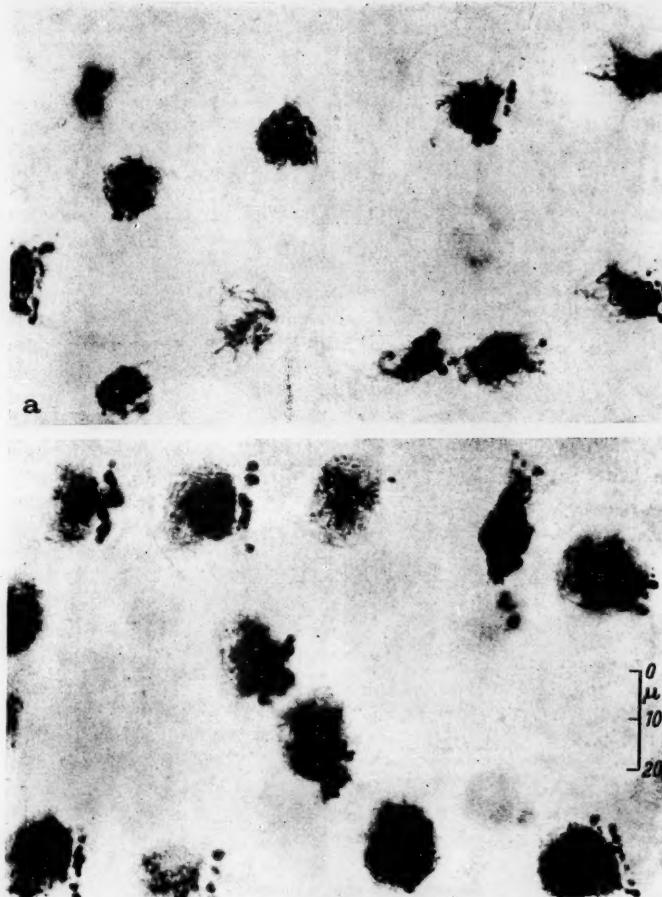


Fig. 7a and b. Oriented extrusion of chromatin globules from microsporocyte nuclei in pieces of anthers, *Lilium*, zygote, 16.0 mm bud. Carnoy-fixed (a) and frozen-dried piece (b) from same anther. Magnification ca. 780 \times

globules stain with Feulgen for DNA and mercuric bromphenol blue for protein, as in the intact tissue. Moreover, the sensitive period for the

production of extrusion by injury corresponds to the period when extruding cells appear in uninjured locules, except that it also includes

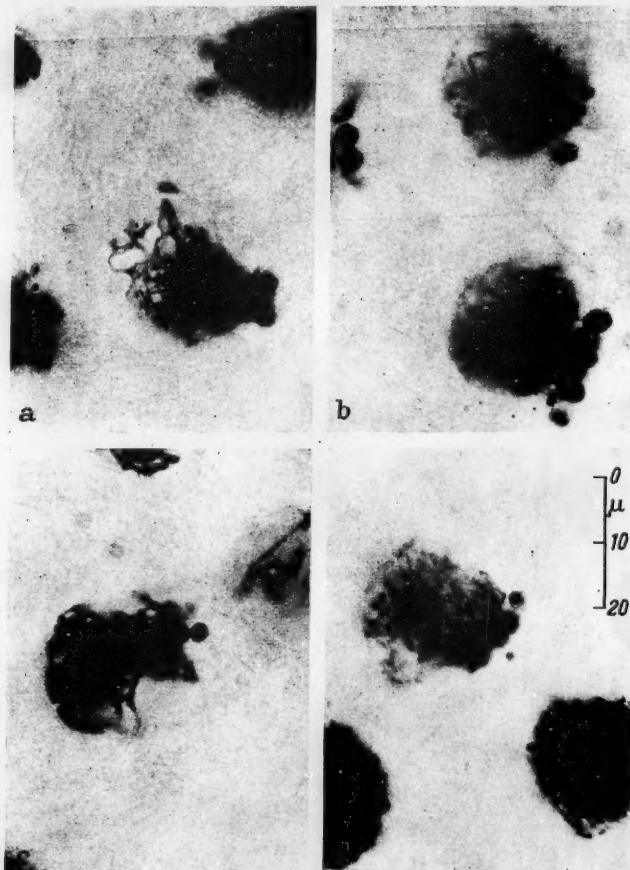


Fig. 8a—d. Extrusion of chromatin globules from microsporocyte nuclei in pieces of anthers, *Lilium*. Zygote (a, b), 16.0 mm bud; pachytene (c, d), 18.0 mm bud. Compare Carnoy-fixed piece on left with frozen-dried piece on right from same anther. Magnification ca. 1050 \times

late leptotene. It is not known whether the process is simply the squirting of material through nuclear membrane pores as through a sieve, or whether

Table 4. Variation in extrusion frequency according to handling procedure. *Lilium*

Two buds were scored at each of the indicated bud lengths; the column values were drawn from the tip portions of three adjacent anthers. Each value is based on ca. 100 microsporocytes scored in a smear. Microsporocytes with free cytoplasmic globules are included in the score.

Method of handling anther	Per cent extruding microsporocytes at different bud lengths			
	14.0 mm	15.5 mm	17.0 mm	
Cut in air, then immersed in fixative	84	83	95	40
Cut while immersed in fixative . . .	79	74	72	75
Not cut, fixed whole	14	21	17	1
	5			

the membrane is actually distended and buds off to form a sac enclosing a portion of the nuclear contents.

Tapetal breakdown produced by injury exhibits a range of cellular changes that also includes chromatin extrusion. Proximal to the point of injury there is a zone of complete cell disruption, in which cell limits are lost and nuclear contents coalesce. Distally, the cell nuclei are distorted or lobulated and intergrade with cells whose nuclei produce small globules. The latter quite abruptly give way to morphologically intact cells. Both dividing and interphase nuclei extrude globules. If wounded anthers are left on the plant, an increasing number of tapetal cells will be affected, so that within 24 hours nearly all these cells in the locules are disrupted. Tapetal extrusion also appears spontaneously in intact anthers that are left to grow for 48 hours or more in buds which have been opened to excise other anthers (Fig. 9).



Fig. 9. Spontaneous tapetal extrusion in *Lilium*, occurring when anthers are left to grow in buds previously opened to excise other anthers. Extruded globules are regularly oriented toward the base of the locule. Magnification ca. 1050 \times

4. Fixation effects on extrusion

Qualitative comparisons were made in *Allium* between acid-alcohol, formaldehyde, and osmium fixatives. Extrusion occurs with each of these, but there is a distinction as to the type of extruding cell. The range of cell types mentioned in section 1 appears after acid-alcohol fixation (Carnoy, Newcomer). Only the more extreme types, associated

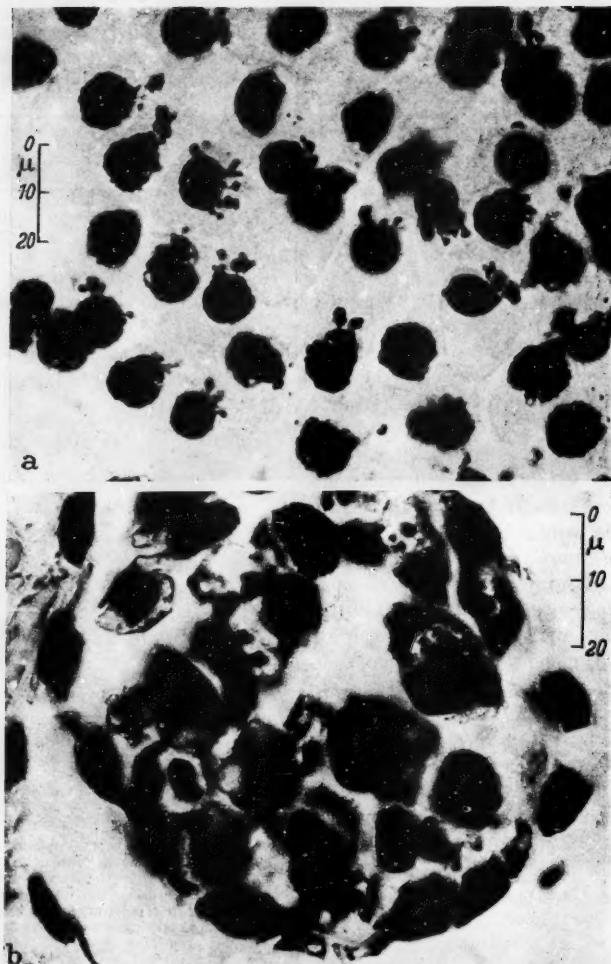


Fig. 10a and b. Severe extrusion in *Allium*, showing smeared microsporocytes from formaldehyde-fixed anther (a) and cross-section of a degenerating locule, osmium-fixed (b). Here the sporogenous tissue and tapetum have shrunken away from the locule wall. Magnifications ca. 780 \times (a) and ca. 1050 \times (b).

with degeneration of the locule contents, are present after formaldehyde or osmium (Fig. 10).

Formaldehyde or osmium could not be used successfully with whole anthers of *Lilium*. When small pieces of anthers are fixed the osmotic shock on cutting apparently overrides fixative effects; extrusion is very rapid. The cells in such pieces fixed in formaldehyde or osmium are grossly comparable to those fixed in Carnoy or frozen. However, nuclear detail after formaldehyde is badly distorted; this may be due to the large amount of shrinkage that occurs during dehydration. Shrinkage may also explain the free cytoplasmic globules present in many cells of osmium-fixed material. Faa and Craf can be used with whole anthers, but extrusion is not appreciably different from that after Carnoy.

Some quantitative data suggesting that the extrusion response may be altered even with acid-alcohol fixation were obtained in experiments designed to alter the direction and concentration gradient of the fixing fluid as it penetrates the sporogenous tissue. Anthers from the same bud of *Lilium* were fixed in Carnoy so that they were either completely or partially immersed. The fixative penetrates the exposed portion rapidly enough to prevent autolysis, but more slowly and in more dilute concentration than if the tissue were completely immersed. Data from three experiments are given in Tables 5, 6 and 7. The results are not

Table 5. Effect of fixation on extrusion frequency. *Lilium*

The number of extruding cells per 200 apical microsporocytes was scored in longitudinal sections. For the difference between means, $t = 4.05$, $p < 0.01$. (The values were not transformed.)

Fixation treatment	Per cent extruding microsporocytes at tip of locule							Mean of locule means \pm S.E.	
	Locule number (Values in columns are from adjacent 25μ sections)								
	1	2	3	4	5	6	7		
Anthers immersed (anthers no. 1-3) . . .	3 1.5 1.5	11 13 11	10 8 14	16 8 10	15 8 5	8.5 8 14.5	14.5 13.5 10.1	10.1 ± 1.58	
Anther tips exposed (anthers no. 4-6) . . .	3 5.5 4.5	3.5 4 4.5	0 3 5	3.5 3 5	4.5 2	5.5 2 2.5		3.26 ± 0.60	

conclusive but suggest a higher frequency of extrusion when fixation is by complete immersion. The fixation difference in the first experiment is highly significant; in the second the anther values are heterogeneous but show a difference in the same direction; in the third there is no difference. It is also interesting to note that the inter-locule variation in the second experiment (Table 6) is consistent with the anther

Table 6. *Effect of fixation on extrusion frequency. Lilium*

Approximately 200 microsporocytes were scored per locule, proceeding equivalent distances apically in serial cross-sections (25μ) from the locule base.

Anther number	Fixation treatment	Per cent extruding microsporocytes at base of anther				Mean per anther	
		Locule number					
		1	2	3	4		
1	Anther immersed	21.69	18.91	23.81	15.89	20.08	
2	Anther immersed	6.57	0.50	6.53	10.94	6.14	
3	Anther immersed	8.86	14.08	12.25	13.46	12.16	
4	Anther base exposed	0.51	0.94	3.00	1.49	1.49	
5	Anther base exposed	8.00	3.38	1.49	0.0	3.22	
6	Anther base exposed	8.04	3.92	10.05	3.38	6.35	

Table 7. *Effect of fixation on extrusion frequency. Lilium*

Approximately 200 microsporocytes were scored per locule, proceeding equivalent distances apically in serial cross-sections from the locule base (Table 7a) or basally from the locule tip (Table 7b). The single aberrant value in Table 7b is not due to obvious injury.

Table 7a

Anther number	Fixation treatment	Per cent extruding microsporocytes at base of anther				Mean per anther	
		Locule number					
		1	2	3	4		
1	Anther immersed	2.49	3.48	3.38	1.01	2.59	
2	Anther immersed	5.05	10.73	4.29	2.56	5.66	
3	Anther base exposed	6.03	4.35	0.50	1.01	2.97	
4	Anther base exposed	2.90	12.25	13.07	1.91	7.53	

Table 7b

Anther number	Fixation treatment	Per cent extruding microsporocytes at tip of anther				Mean per anther	
		Locule number					
		1	2	3	4		
1	Anther immersed	23.65	2.51	3.05	8.76	9.49	
2	Anther immersed	2.38	1.99	7.39	0.48	3.06	
3	Anther tip exposed	5.50	3.37	1.01	5.05	3.73	
4	Anther tip exposed	6.80	0.51	1.44	2.54	2.82	

variation, contrary to the random variation observed for the buds represented in the data of Table 1. The reason for the discrepancy between experiments is not known.

IV. Discussion and Conclusions

1. DNA transfer from the tapetum

The reutilization by the microsporocytes of DNA breakdown products from the degenerating tapetum has been suggested by LINSKENS (1958). The reported drop in DNA for the total anther contents and concomitant

increase in breakdown products in the tapetum can not be given a morphological correlation, however, since the tapetum does not degenerate until after meiosis is complete. FOSTER and STERN (1958) have given data contradictory to LINSKEENS on the presence of soluble deoxyribose compounds in *L. longiflorum* anthers: they have shown that there is a drop in the level of such compounds rather than an increase during first meiotic prophase.

COOPER (1952) made two observations that were critical for his hypothesis of DNA transfer. The first of these was that the apparently cytoplasmic globules were actually on the surface of the microsporocytes. The second was that the tapetum extruded chromatin prior to the time when the globules were found associated with the microsporocytes. Neither of these observations could be confirmed in this study. The failure to find tapetal extrusion is puzzling. In *Lilium regale* and *L. henryi*, used by COOPER, the tapetal nuclei have divided before extrusion begins. In *L. longiflorum*, used here, mitosis in the tapetum does not begin until after zygote, when the microsporocytes already show the characteristic globules. Possibly the membranes of newly formed nuclei more readily allow the passage of material or are more susceptible to deformation than older membranes. This explanation does not seem plausible, however, since in *Allium cepa*, which was also reported to extrude, the tapetum remains uninucleate. Some of the results of TAYLOR and McMMASTER (1954) suggest that the properties of tapetal DNA change during the period of synthesis, with the DNA made earlier being more labile to acid hydrolysis than that made later. This might be pertinent if the timing of the tapetal DNA synthesis in the different species were such that zygote-pachytene coincided with different portions of the synthetic period. However, it appears to be nearly the same in the two species (one binucleate, one uninucleate) for which data are available. In *L. henryi* synthesis occurs after the cells are binucleate, when the microsporocytes are at mid-zygote to early pachytene (PLAUT 1953). In *L. longiflorum* it also occurs at late zygote to early pachytene (TAYLOR and McMMASTER 1954; TAKATS 1958, unpublished).

RASCH and SWIFT (personal communication, and SWIFT 1953) have shown photometrically that in *L. longiflorum* the combined extinctions of the microsporocyte nucleus and the associated chromatin globules give the expected 4C value of Feulgen-positive material; the globules contribute about 10% of the total. The possibility that the tapetum is acting as a reservoir from which DNA is transferred selectively to deficient microsporocytes was eliminated by the more direct experiments of TAYLOR and McMMASTER (1954), using autoradiographic techniques to follow P^{32} incorporation into DNA. The fact that the labelling of the chromatin globules always corresponds to that of the microsporo-

cytes has been confirmed now with H^3 -cytidine, which affords better resolution than P^{32} .

Transfer phenomena analogous to that reported by COOPER have been found during spermatogenesis in a number of insects (BATTAGLIA 1950; MONTALENTI et al. 1950). Here RNA is secreted in granular form by follicular cells, or the chromatin of degenerating nuclei is thought to be converted into RNA. SCHRADER and LEUCHTENBERGER (1952) and BONHAG (1955), also in insects, and LISON and FAUTREZ-FIRLEFYN (1950) in a crustacean, have found that certain nuclei in the ovarian chamber regularly degenerate and presumably are converted into Feulgen-negative material. The interpretation in all these cases is that the RNA is used by the developing meiotic cells and is essential to their metabolism. No independent biochemical data support the conversion of deoxyribotides to ribotides.

2. Degeneration of microsporocytes

The simplest explanation for extrusion would be that a certain proportion of the microsporocytes in an anther degenerate in this manner. A low frequency of aborted microspores and pollen grains is a common observation in normal plant microgametogenesis. Analogous phenomena are known in normal spermatogenesis in animals (ROOSEN-RUNGE 1955; OAKBERG 1956), and differential spermatogonial mitosis has been reported to produce degenerative spermatocytes in certain insects (BAUER and BEERMANN 1952). The evidence from *Lilium* on the degeneration of microsporocytes is completely negative, however. From the time when extruding cells appear until they disappear there is no accumulation of pycnotic cells, and the total number of cells in each anther remains constant within the limits of expected variability. The very low frequency of cells that are pycnotic or extruding nucleolar fragments varies in parallel with the frequency of cells extruding chromatin.

Arguments for degeneration can be based on the comparative morphology of pycnotic cell types. Somatic nuclei that extrude chromatin usually degenerate. In the root tip cells of *Allium cepa*, chromatin extrusion resembling that from microsporocyte nuclei can be produced artificially by treatment with derivatives of phenoxyacetic acid (NYGREN 1949) or penicillin (LEVAN and TJIO 1951); these cells usually do not recover. Degenerating cells whose nuclei show many protruding lobes are one of a spectrum of nuclear types found to occur spontaneously in mouse lymphosarcoma (LEVAN and HAUSCHKA 1953). The transient animal cells involved in presumptive transfer of RNA to meiotic cells have already been mentioned. In the *Allium* material examined here, the entire contents of individual locules frequently degenerate, and it is natural to conclude that the extreme types of extruding microsporo-

cytes in these locules represent the terminal stages of less severe extrusion. FRASER (1914), DIGBY (1914), and GATES and REES (1921) came to this conclusion from studies of microsporogenesis in *Vicia faba*, *Crepis virens*, and *Lactuca*, respectively. However, without the demonstration of spatial contiguity of affected cells, or some reference time scale, this type of evidence is difficult to evaluate. There is no way to exclude the possibility that separate but parallel mechanisms operate to produce similar end results. The present *Allium* observations bear this out in showing that there is no transitional stage within an affected locale.

3. Extrusion as an artifact

The clear-cut effects of wounding can explain some of the varying observations in the literature on the frequency of extrusion and the orientation of extruded material. Abrupt, localized increases in frequency, to the extent that nearly all the microsporocytes extrude, were noted by earlier investigators but not related to injury (DIGBY 1914; WEST and LECHMERE 1915; SPARROW and HAMMOND 1947). Directionality of extrusion has been described by KÖRNICKE (1901), GATES (1911), and WEST and LECHMERE (1915). Both these effects are regularly produced by wounding. The point of injury in such cases may very easily be overlooked unless the anther is reconstructed from serial sections. The sudden pressure differential orients extrusion toward the point of injury. The freezing experiments with small pieces of anthers demonstrate that extrusion produced in this way occurs very rapidly and is not a response to the subsequent penetration of the fixative; fixation simply halts the irreversible breakdown. This is indicated also by the generally lower frequency of extrusion when the handling procedure is altered so that fixation occurs simultaneously with cutting.

The effects of wounding during handling may be considered pertinent to the conclusions about degeneration. Since the extruding cells in injured tissue rapidly pass through a stage in which they are apparently identical to those in intact tissue, it might be predicted that the latter also degenerate. However, in the experiments on wounding the tissue is not allowed to recover. The simplest interpretation of the effect is that it exaggerates conditions that may obtain during routine handling procedures.

The distinction between extruding cells that degenerate and those that do not, brought out in section 2, is made more plausible by the differential effect of various fixatives in *Allium*: after formaldehyde or osmium fixation, only the degenerating type of cell appears. TAYLOR and McMMASTER (1954) have claimed that chromic acid-osmium fixation reduces the frequency of extrusion in *Lilium longiflorum*. These two observations are the best evidence that the typical extruding cell is an

artifact of acid-alcohol fixation. The present experiments designed to alter the concentration gradient of Carnoy as it penetrates the spogenous tissue of *Lilium* have not satisfactorily settled the question, although they point in the direction of this view.

The shift in frequency of extrusion as meiosis proceeds might be interpreted as indicating a normal process with a peak period of sensitivity. The failure to find any change in the total number of microsporocytes, and the virtual absence of degenerating microsporocytes in intact anthers of *Lilium*, might further be taken to support many earlier observations on the apparent recovery of affected cells (DIGBY 1909; GATES 1911; WEST and LECHMERE 1915; SPARROW and HAMMOND 1947; COOPER 1952). If one assumes recovery, it is important to note that extrusion is not analogous to chromatin diminution and does not involve elimination of accessory chromosomes; there is simply an irregular transfer of chromatin between certain developing microsporocytes. SPARROW and HAMMOND (1947) have considered extrusion the result of unknown factors operating during the normal development of the anther. It is conceivable that some extrusion could occur, for example, in response to suddenly altered osmotic conditions. Such effects, however, can not be checked directly. On the basis of the present results, it is considered more likely that the extruding microsporocytes are produced entirely by the procedures involved in handling and fixing the tissue. The method of analysis makes it impossible to trace cells directly from one stage to another; different populations must be sampled at different times. Hence the extruding microsporocytes might be produced at each stage. They would then only be indicators of the changing physical fragility of the cell membranes and nuclear material; this would make plausible their rapid and complete disappearance during pachytene. The fact that they occur with considerable frequency in intact anthers is not satisfactorily explained. Nevertheless, the present results on the effects of fixation make it seem more reasonable to question their normal occurrence than to assume their recovery.

Summary

1. Tapetal extrusion does not occur as a regular process under normal conditions. Autoradiographic experiments of other workers using P^{32} were repeated with H^3 -cytidine as a label for nucleic acid pyrimidines. There is no evidence for transfer of DNA from the tapetum to the microsporocytes during the early first prophase stages of meiosis. The typical chromatin globules associated with the microsporocytes are extruded from them.

2. The frequency of extruding microsporocytes in intact anthers of *Lilium longiflorum* rises rapidly following leptotene to a maximum at

the end of zygotene, then drops abruptly during pachytene. The number of such cells is extremely variable between different locules of the same anther and the lateral distribution in the locule is often non-random.

3. Extrusion in intact anthers of *L. longiflorum* does not result in degeneration. The frequency of pycnotic cells is very low during first prophase and varies in parallel with the frequency of extruding cells, rather than increasing as the latter decreases. There is no evidence that the total number of microsporocytes changes. In *Allium cepa*, degenerating locules contain extruding microsporocytes. However, these are clearly distinguishable from those in normal locules, and do not occur together with cells which can be interpreted as transitional types. They do not replace the extruding cells in normal locules at post-zygotene stages.

4. Wounding regularly increases the frequency of extrusion at the same stages during which it occurs in intact anthers. If the material is fixed immediately after injury the effect is localized, and the extruding microsporocytes are morphologically and cytochemically the same as those in intact anthers. Otherwise the cells rapidly degenerate.

5. Different fixatives can be separated according to their effects on extrusion in intact anthers of *A. cepa*. Extruding cells are present after fixation with acid-alcohol, formaldehyde, or osmium, but those typical to normal locules do not occur after formaldehyde or osmium. Acid-alcohol fixation can probably increase the frequency of extrusion in intact anthers of *L. longiflorum*, but experiments will have to be refined before this can be demonstrated adequately.

6. Alternative explanations for extrusion are discussed in relation to the present findings. The results may be explained in two ways: either extruding cells occur normally and recover, or they appear strictly as artifacts of handling and fixation. The latter explanation is preferred. Particular types of handling injury have been shown to reproduce some characteristics of extrusion noted in the literature. Fixation effects are considered to at least partially account for extrusion in intact anthers.

Acknowledgments. A large part of this paper was taken from a thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy at the University of Wisconsin. The author is deeply indebted to Dr. D. C. COOPER and Dr. HANS RIS for much patient advice and encouragement during the entire study. Most of the work was done in the laboratory of Dr. COOPER; facilities for the preparation of frozen material were provided by Dr. RIS. Mr. GEORGE SOCHA gave expert help with the photomicrography. Some autoradiographic experiments were started with Dr. WALTER S. PLAUT, whose interest and help is greatly appreciated. During a short stay at Columbia University, Dr. J. H. TAYLOR of the Department of Botany very kindly provided facilities for study. The autoradiographic results reported here were obtained in the laboratory of Dr. P. S. WOODS, Biology Department, Brookhaven National Laboratory. Special thanks are due to Drs. D. C. COOPER, HANS RIS, A. H. SPARROW, and J. H. TAYLOR for critically reviewing the manuscript.

Bibliography

- BATTAGLIA, B.: Richerche sul metabolismo degli acidi nucleici nella spermatogenesi degli *Ortotteri* (*Acrididae*). *Riv. Biol.* **42**, 27—43 (1952).
- BAUER, H., u. W. BEERMANN: Der Chromosomenzyklus der Orthocladiinen (*Nematocera, Diptera*). *Z. Naturforsch.* **7b**, 557—563 (1952).
- BONHAG, P. F.: Histochemical studies of the ovarian nurse-tissues and oocytes of the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (DALLAS). I. Cytology, nucleic acids, and carbohydrates. *J. Morph.* **97**, 381—440 (1955).
- CHAYEN, J.: Pectinase technique for isolating plant cells. *Nature (Lond.)* **170**, 1070—1072 (1952).
- COOPER, D. C.: The transfer of deoxyribonucleic acid from the tapetum to the microsporocytes at the onset of meiosis. *Amer. Naturalist* **86**, 219—229 (1952).
- DIGBY, L.: Observations on "chromatin bodies" and their relation to the nucleolus in *Gallonia candicans*. DECSNE. *Ann. Botany* **23**, 491—502 (1909). — A critical study of the cytology of *Crepis virens*. *Arch. Zellforsch.* **12**, 97—146 (1914).
- ERICKSON, R. O.: Cytological and growth correlations in the flower bud and anther development of *Lilium longiflorum*. *Amer. J. Bot.* **35**, 729—739 (1948).
- FOSTER, T. S., and H. STERN: Soluble deoxyribosidic compounds in relation to duplication of deoxyribonucleic acid. *Science* **128**, 653—654 (1958).
- FRASER, A. C. L.: The behavior of the chromatin in the meiotic divisions of *Vicia faba*. *Ann. Botany* **28**, 633—642 (1914).
- GATES, R. R.: Pollen formation in *Oenothera gigas*. *Ann. Botany* **25**, 909—940 (1911).
- GATES, R. R., and E. M. REES: A cytological study of pollen development in *Lactuca*. *Ann. Botany* **35**, 365—398 (1921).
- KÖRNICKE, M.: Über Ortsveränderung von Zellkernen. S.-B. Niederrhein. Ges. Natur- u. Heilk. zu Bonn, S. 14—25, 1901.
- LEVAN, A., and T. S. HAUSCHKA: Nuclear fragmentation — a normal feature of the mitotic cycle of lymphosarcoma cells. *Hereditas (Lund)* **39**, 137—148 (1953). —, and J. H. TJIO: Penicillin in the *Allium* test. *Hereditas (Lund)* **37**, 306—324 (1951).
- LINSKENS, H. F.: Physiologische Untersuchungen zur Reifeteilung. II. Mitt. Über die Änderung des Nukleinsäuregehaltes während der Pollenmeiose und Pollenentwicklung von *Lilium henryi*. *Acta bot. nér. 7*, 61—68 (1958).
- LISON, L., and N. FAUTREZ-FIRLEFFYN: Deoxyribonucleic acid content of ovarian cells in *Artemia salina*. *Nature (Lond.)* **166**, 610—611 (1950).
- MAZIA, D., P. A. BREWER and M. ALFERT: The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromphenol blue. *Biol. Bull.* **104**, 57—67 (1953).
- MONTALANTI, F., G. VITAGLIANO and M. DE NICOLA: The supply of ribonucleic acid to the male germ cells during meiosis in *Assellus aquaticus*. *Heredity* **4**, 75—87 (1950).
- NEWCOMER, E. H.: A new cytological and histological fixing fluid. *Science* **118**, 161 (1953).
- NYGREN, A.: Cytological studies on the effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2-methyl, 4-chlorophenoxyacetic acid, and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid on *Allium cepa*. *Ann. roy. Agric. Coll. Sweden (Uppsala: Kungl. Lantbruks-hogskolans Annaler)* **16**, 723—728 (1949).
- OAKBERG, E. F.: A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Amer. J. Anat.* **99**, 391—414 (1956).
- PLAUT, W. S.: DNA synthesis in the microsporocytes of *Lilium henryi*. *Hereditas (Lund)* **39**, 438—444 (1953).

- ROOSEN-RUNGE, E.: Untersuchungen über die Degeneration samenbildender Zellen in der normalen Spermatogenese der Ratte. *Z. Zellforsch.* **41**, 221—235 (1955).
- RUSSELL, R. S., F. K. SANDERS and O. N. BISHOP: Preparation of radioautographs to show the distribution of phosphorus-32 in plant tissues. *Nature (Lond.)* **163**, 639—640 (1949).
- SCHRADER, F., and C. LEUCHTENBERGER: The origin of certain nutritive substances in the eggs of *Hemiptera*. *Exp. Cell Res.* **3**, 136—146 (1952).
- SPARROW, A. H., and M. R. HAMMOND: Cytological evidence for the transfer of desoxyribose nucleic acid from nucleus to cytoplasm in certain plant cells. *Amer. J. Bot.* **34**, 439—445 (1947).
- SWIFT, H.: Quantitative aspects of nuclear nucleoproteins. *Int. Rev. Cytol.* **2**, 1—76 (1953).
- TAYLOR, J. H.: The duration of differentiation in excised anthers. *Amer. J. Bot.* **37**, 137—143 (1950). — Autoradiography at the cellular level. In *Physical techniques in biological research*, vol. 3, chap. 11, p. 545—576, edit. by J. OSTER and A. W. POLLISTER. New York: Academic Press 1956.
- , and R. D. McMMASTER: Autoradiographic and microphotometric studies of desoxyribose nucleic acid during microgametogenesis in *Lilium longiflorum*. *Chromosoma (Berl.)* **6**, 480—521 (1954).
- WEST, C., and A. E. LECHMERE: On chromatin extrusion in pollen mother cells of *Lilium candidum*, LINN. *Ann. Botany* **29**, 286—292 (1915).
- WOODS, P. S.: A chromatographic study of hydrolysis in the Feulgen nucleal reaction. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 71—88 (1957).
- , and A. W. POLLISTER: An ice solvent method of drying frozen tissue for plant cytology. *Stain Technol.* **30**, 123—131 (1955).

Dr. STEPHEN T. TAKATS
Biology Department, Brookhaven National Laboratory
Upton, Long Island/New York, U.S.A.

Aus dem Biologischen Institut der Keiō-Universität zu Yokohama
DIFFERENTIELLE FÄRBUNG DER CHROMOSOMEN
DER ERSTEN MEIOTISCHEN METAPHASE
VON CYPRIPEDIUM DEBILE*

Von

NORIKO YAMASAKI

Mit 22 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. April 1959)

In der vorhergehenden Arbeit (YAMASAKI 1956) ist über die Methodik und das Ergebnis der differentiellen Färbung der somatischen *Metaphasechromosomen* von *Cypripedium debile* berichtet worden. Für die mitotischen sowie die meiotischen *Prophasechromosomen*, besonders die Pachytänchromosomen, liegen schon ziemlich viele Angaben vor, daß sie differentiell gefärbt und dadurch karyotypisch analysiert wurden.

Kürzlich gelang es der Verfasserin, die ersten meiotischen *Metaphasechromosomen* von *Cypripedium* differentiell zu färben. Da Angaben über die Färbungsdifferenzierung der ersten meiotischen Metaphasechromosomen, wie sie hier beobachtet worden ist, bis jetzt kaum gemacht worden sind, sollen die Befunde und ihre methodischen Grundlagen hier mitgeteilt werden.

Material und Methode

Die Ausgangspflanzen wurden am Fuß des Berges „Fuzi“ in der Provinz Yamanashi gesammelt¹ und in unserem Institut in Töpfen weitergezogen. Für die Beobachtung der meiotischen Chromosomen wurden Pollenmutterzellen (P.M.Z.) verwendet.

Die Fixierung wurde nach der Methode der Verfasserin ausgeführt; die Färbung war im wesentlichen eine Feulgensche Nuklealfärbung. Fixiert wurde in folgender Weise: Eine Anthere wird für 20 min in ein Gemisch aus 12 Teilen 22%iger Essigsäure und 1 Teil n HCl gebracht; dabei muß die Temperatur des Gemisches in den ersten 5 min 45° C und in den weiteren 15 min 60° C betragen. Durch dieses Verfahren werden Fixierung und Mazeration gleichzeitig erzielt. Danach wird die Anthere unmittelbar in ein Gemisch aus 3 Teilen 22%iger Essigsäure und 1 Teil 75%igem Alkohol gebracht und bleibt darin 4 min lang bei normaler Temperatur, wodurch die Wirkung der HCl unterbrochen wird. Darauf wird die Anthere nach Feulgen bei einer Hydrolysedauer von 7 min gefärbt.

Die so behandelte Anthere wird auf einem Objektträger in 45%ige Essigsäure gebracht und ein Deckglas aufgelegt. Schwacher Druck auf das Deckglas preßt die P.M.Z. heraus; nach Umrandung mit einem beliebigen Einschlußmittel ist das

* Contribution from the Biological Institute, Keiō-University No. 12.

¹ Herrn K. SUZUKI, der mir bei der Gewinnung des Materials freundliche Hilfe geboten hat, möchte ich hier meinen verbindlichsten Dank aussprechen.

Präparat zur Beobachtung fertig. Das Deckglas muß so sanft und vorsichtig wie möglich angedrückt werden; sonst werden die Querstreifen undeutlich oder unsichtbar, und im schlimmsten Fall werden die ganzen Bivalente so beschädigt, daß sie unbrauchbar sind; denn die auf diese Weise behandelten Bivalente sind in viel höherem Maße brüchig als gewöhnlich präparierte.

Im Laufe von 2 Wochen nach der Herstellung des Präparates nimmt die farberische Differenz zwischen den Querstreifen und den blau gefärbten Teilen allmählich zu; das Streifenmuster ist am deutlichsten in der Periode von der 3.—5. Woche zu erkennen. Nach dem Ablauf dieser Periode werden die Querstreifen allmählich blässer.

Wie die somatischen Metaphasechromosomen konnten auch Bivalente durch Essigorcein zwar differentiell gefärbt werden, doch bleiben die Querscheiben infolge starker Schwellung der Bivalente undeutlich. Man darf erwarten, daß gewisse Veränderungen der Technik einen besseren Erfolg bringen. Als Beispiel dafür sind Abb. 20—22 gezeigt. Hier wurde die Anthere fixiert und gleichzeitig gefärbt durch das Gemisch von 9 Teilen 0,25%iger Orcinlösung in 45%iger Essigsäure und 1 Teil in HCl, dabei wurde die Temperatur des Gemisches für 7 min bei 45° C gehalten, dann bis zu 60° C erhöht und blieb für 25 min unverändert. Dann wurde die Anthere auf einen Objektträger in 0,25%iges Essigorcein gebracht, hier wurden das Exothecium, Endothecium und Tapetum entfernt, um nur die P.M.Z. allein zu erhalten. Ohne Druck wurde ein Deckglas darauf gelegt und mit einem Einstichmittel umrandet. In 10 Tagen nach Präparation waren diese Präparate zur Beobachtung geeignet.

Alle Mikrophotographien wurden mit der Aufsetzkamera „Makam“ von Leitz hergestellt.

Befunde

Der somatischen Chromosomenzahl von $2n = 20$ entsprechend, sind bei *Cypripedium debile* in der M-I der P.M.Z. 10 Bivalente vorhanden. Abb. 1 zeigt die allgemeinen Verhältnisse der M-I in einem nach gewöhnlicher Essigorcein-Methode fixierten und gefärbten Präparat. Wie aus Abb. 1 ersichtlich ist, zeigten diese 10 Bivalente nichts Besonderes hinsichtlich der Färbung; sie färbten sich dunkel und homogen.

Abb. 2 zeigt eine P.M.Z., bei der MATSUURAS „water pretreatment“ vor der gewöhnlichen Essigsäureorcein-Färbung durchgeführt wurde. Infolge der Vorbehandlung wird der Doppelspiralbau der Bivalent-chromosomen deutlich. An der mit einem Pfeil bezeichneten Stelle, auf die scharf eingestellt worden ist, sind die Kleinspiralen recht klar zu beobachten. Betreffend des allgemeinen Baues der Bivalentchromosomen findet man aber nichts Besonderes im Vergleich mit anderen Arten.

Dagegen färbten sich die Bivalentchromosomen differentiell, wenn die Fixierung und Färbung wie oben (S. 454) dargestellt ausgeführt wurde. Es traten dann jene „Querstreifen“ wieder zutage, die gegenüber den von der Verfasserin schon an somatischen Metaphasechromosomen beobachteten keinen Unterschied aufwiesen (YAMASAKI 1956). Ihre Zahl, Breite und Lage nur sind nicht für jedes bestimmte Chromosom konstant, sondern sie sind auch deutlich und ausnahmslos symmetrisch auf die

Partnerchromosomen verteilt, was der Beobachtung von MIDUNO (unveröff.) entspricht, daß in bezug auf das Querstreifenmuster je 2 Chromosomen von ganz gleichem Typus im diploiden Bestand vorhanden sind.

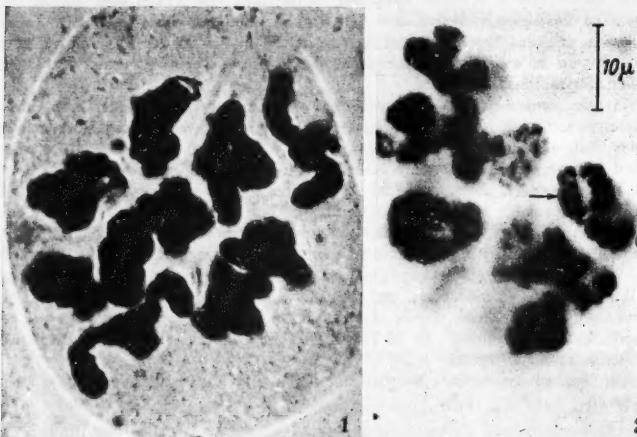


Abb. 1 u. 2. Metaphasen I nach üblichen Färbungen. 1 Färbung durch Essigorcein.
2 MATSUURAS Wasser-Vorbehandlung und Färbung durch Essigorcein. Vergr. 1350 ×

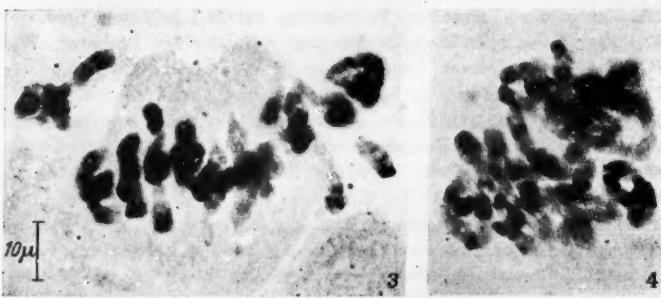


Abb. 3 u. 4. Metaphasen I, differentiell gefärbt. Vergr. 900 ×

Abb. 3 und 4 zeigen in Übersicht Metaphaseplatten mit farbungs-differenzierten Bivalanten. Wenn auch die Stellen, wo Chromosomen übereinanderliegen, wegen der stärkeren Lichtabsorption in den Photographien ebenfalls schwarz dargestellt worden sind, so können doch die Querstreifen der günstig gelagerten Chromosomen eindeutig erkannt werden. In Abb. 3 sind alle 10 Bivalente erkennbar, wobei nur das

2. und das 3. von rechts sich etwas überdecken; man kann mediane oder submediane Lage ihrer Kinetochoren erkennen, wie MIDUNO (unveröff.) es an somatischen Chromosomen festgestellt hatte.

Die Abb. 5—14 geben einzelne Bivalente wieder, die so gut wie möglich in einer optischen Ebene liegen. Anders als bei somatischen Chromosomen, die man durch den Druck auf das Deckglas ziemlich flach legen kann, bleiben nach der obenerwähnten Präparation die Bivalente mehr

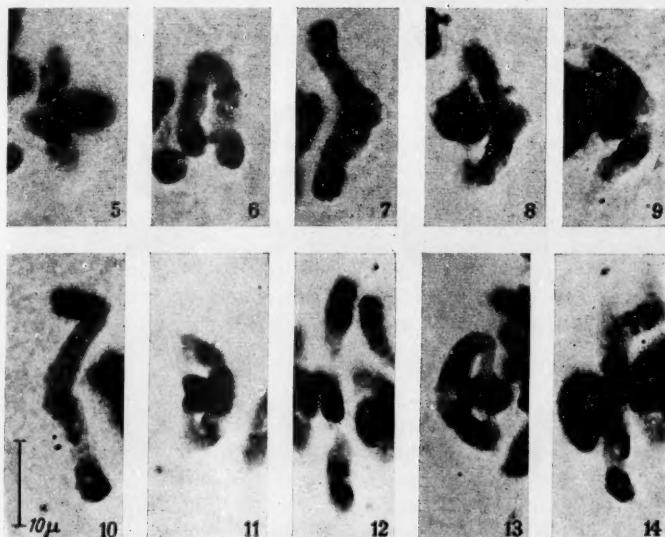


Abb. 5—14. Einzelne Bivalente nach differenzierter Färbung. Vergr. 1350×.
Erklärung im Text

oder weniger räumlich ausgedehnt, und einige der Querstreifen oder ein ganzer Schenkel eines Chromosoms bleiben unvermeidlich außer Focus, obwohl beim Photographieren möglichst günstige Fälle ausgewählt wurden sind.

Das Bivalent in Abb. 5 zeigt 2 Querstreifen dicht an einem interstitiellen Chiasma; es ist sicher aus 2 Chromosomen mit je einem Querstreifen gebildet.

Abb. 6 zeigt ein Bivalent mit einem terminalen Chiasma, an dem es umgebogen ist. In jedem der gepaarten Chromosomen findet man 2 Querstreifen, und zwar den einen am chiasmafreien Chromosomenende und den anderen an der Nähe der betreffenden terminalen Chiasma. Nach dem Querstreifenmuster beurteilt, muß das Bivalent mit einem

subterminalen Chiasma in Abb. 7 wohl das gleiche wie das in Abb. 6 sein.

Abb. 8 und 9 zeigen Bivalente, bei denen Chromosomen sich durch je ein Chiasma in ihren beiden Schenkeln paaren. Die Querstreifen an jedem der gepaarten Schenkel, die scharf abgebildet sind, lassen sich gut erkennen; sie sitzen ungefähr in der Mitte der chiasmaproximalen Abschnitte. An den anderen, nicht in der Einstellebene liegenden

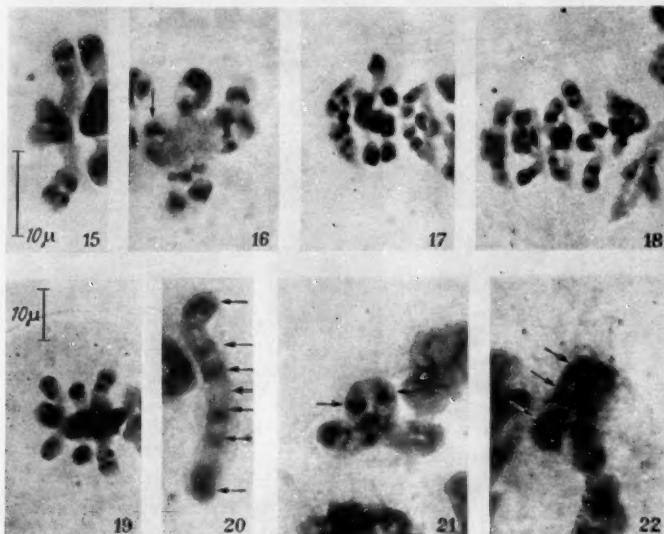


Abb. 15—22. Weitere Beispiele für differentielle Färbung. 15—19 Feulgenfärbung. 20—22 Essig-Salzsäure-Orceinfärbung. 17—19 Vergr. 810 \times , die übrigen 1350 \times

Chromosomenschenkeln sitzt, wenngleich das Chiasma die genaue Beobachtung verhindert, wohl wenigstens je ein Querstreifen, und zwar am Chromosomenende.

Wenn auch das mittels eines Endchiasmas gepaarte Bivalent in Abb. 10, wie die Bivalente in Abb. 6—9, aus Chromosomen mit 2 Querstreifen besteht, so unterscheidet jenes sich von diesen im Streifenmuster, nämlich dadurch, daß der nahe dem terminalen Chiasma liegende Querstreifen der Partnerchromosomen in Abb. 10 viel kleiner und vom Endchiasma weiter entfernt ist als der der Chromosomen in Abb. 6—9.

In Abb. 11—13 findet man Bivalente, bei denen jedes Chromosom 3 Querstreifen besitzt, davon 2 am mittleren Teil des einen Schenkels

und einen am Ende des anderen Schenkels. Diese 3 Bivalente sind zweifellos identisch, obwohl sie sich durch die Zahl und Stellung der Chiasmen unterscheiden.

Die Bivalente in Abb. 14 und 15 bestehen ebenfalls aus Chromosomen mit 3 Querstreifen, und zwar 2 in einem Schenkel und einen im anderen Schenkel des Chromosoms. Sie unterscheiden sich jedoch von den Bivalenten in Abb. 11—13 dadurch, daß der Querstreifen, der in einem Schenkel allein liegt, nicht endständig ist. Er ist nämlich in Abb. 14 etwas vom Endchiasma entfernt und liegt in Abb. 15 dicht am Ort des interstitiellen Chiasmas, von wo aus die Endteile beider Chromosomen sich ein wenig spreizen.

Das durch ein interstitielles Chiasma gepaarte Bivalent der Abb. 16 besteht aus Chromosomen mit 4 Querstreifen. Von den 4 Querstreifen liegen je 2 an jedem Chromosomenschenkel, und beide Schenkel unterscheiden sich dadurch, daß der eine einen endständigen Querstreifen, der andere dagegen keinen solchen hat. Bei diesem Bivalent kann man also je 2 homologe Schenkel (den einen oben und links, den anderen unten und rechts) feststellen, wenngleich das eine durch einen Pfeil bezeichnete Ende des Chromosomenschenkels nach unten abgebogen und infolgedessen ein Querstreifen, der sich am betreffenden Ende befinden müßte, unsichtbar ist.

In Abb. 17—19 sind mehrere Bivalente gleich scharf wiedergegeben. Es ist deutlich, daß bei allen Partnerchromosomen die Querstreifen ihrer Zahl und Lage nach streng symmetrisch verteilt sind. Die Querstreifenmuster deuten noch an, daß das äußerst links gelegene Bivalent in Abb. 17 mit dem in Abb. 16 identisch ist.

Abb. 20 und 22 zeigen durch Essigorcein gefärbte Bivalente. Wenn der färberische Unterschied auch viel undeutlicher ist und die Bivalente stärker aufgelockert sind im Vergleich zu den feulgengefärbten, so kann man doch, wie durch Pfeile bezeichnet, auch hier Querstreifen feststellen, und zwar 6 in Abb. 20 (der Doppelpfeil bezeichnet das Endchiasma) und 2 in Abb. 21. Das eine Chromosom des Bivalents in Abb. 22 zeigt wenigstens 3 Querstreifen; bei dem Partnerchromosom ist die Struktur infolge schlechter Behandlung nur undeutlich.

Während der meiotischen Prophase bis zur Diakinese kommt bei den Chromosomen der verschiedensten Arten von Lebewesen oft differentielle Färbung vor, meistens, ohne daß diese besonders erwähnt worden ist. So deuten z. B. die Abbildungen von NIGON und BRUN (1955) stark auf eine Färbungsdifferenzierung hin, d. h. auf Querstreifen der Diakineschromosomen, die symmetrisch in den Partnerchromosomen auftreten. Die Autoren beschränken ihre Beschreibung aber auf das Heterochromatin im eigentlichen Sinn. Mit dem Übergang zur Metaphase färben sich nach allen bisherigen Angaben die Chromosomen

immer homogen. Daß sie auch differentiell gefärbt werden können, ist jetzt eindeutig gezeigt. Überdies kamen die Querstreifenmuster stets streng symmetrisch unter den gepaarten Chromosomen vor, was ihre Konstanz beweist. Für die genaue Karyotypanalyse aber sind somatische Metaphasechromosomen viel geeigneter, weil bei den meiotischen Metaphasechromosomen schmale Querstreifen wegen des Doppelspiralaufbaues so wie dem Auftreten von interstitiellen Chiasmata leicht übersehen werden können.

Die Wahrscheinlichkeit, daß die Chromozentren, die *Cypripedium debile* in großer Zahl besitzt (YAMASAKI 1956), mit den Querstreifen einen Zusammenhang haben müssen, veranlaßte mich zu Studien über den Umwandlungsprozeß der Chromozentren zu Querstreifen während des mitotischen und des meiotischen Zyklus; diese Ergebnisse sollen später veröffentlicht werden.

Zusammenfassung

Durch die von der Verfasserin entwickelte Methode der gleichzeitigen Fixierung und Färbung mit einem Gemisch von Orcineessigsäure und Salzsäure sowie der Feulgenschen Reaktion kann man bei *Cypripedium debile* eine eigentümliche Färbungsdifferenzierung der Chromosomen in der Metaphase I von Pollenmutterzellen erhalten; es treten hinsichtlich der Zahl, Breite und Lage konstante, tief gefärbte Querstreifen, wie bei den somatischen Metaphasechromosomen, auf, und die gepaarten Chromosomen zeigen jeweils symmetrische Querstreifenmuster.

Literatur

- MATSUURA, H.: Chromosome studies on *Trillium kamtschaticum* PALL. XI. A simple new method for the demonstration of spiral structure in chromosomes. *Cytologia* (Tokyo) 9, 243—248 (1938).
- NIGON, N., et J. BRUN: L'évolution des structures nucléaires dans l'ovogénèse de *Caenorhabditis elegans* MAUPAS 1900. *Chromosoma* (Berl.) 7, 129—169 (1955).
- YAMASAKI, N.: Differentielle Färbung der somatischen Metaphasechromosomen von *Cypripedium debile*. I. Mitt. *Chromosoma* (Berl.) 7, 620—626 (1956).

Fräulein Dr. N. YAMASAKI
Biologisches Institut, Universität Keiō
Yokohama-Hiyoshi (Japan)

